



Développement, caractérisation et potentiels thérapeutiques d'Elactiv', une protéine élastique biomimétique, inspirée de la tropoélastine humaine

Chloe Lorion

► To cite this version:

Chloe Lorion. Développement, caractérisation et potentiels thérapeutiques d'Elactiv', une protéine élastique biomimétique, inspirée de la tropoélastine humaine. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT: 2015LYO10312 . tel-01332847

HAL Id: tel-01332847

<https://theses.hal.science/tel-01332847>

Submitted on 16 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre **312-2015**

Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue à huis clos le 15 décembre 2015

par

Chloé LORION

**Développement, caractérisation et potentiels
thérapeutiques d'Elactiv', une protéine élastique
biomimétique, inspirée de la tropoélastine humaine**

Directeurs de thèse : Dr. Romain DEBRET et Dr. Jérôme SOHIER

Membres du Jury

Dr. Brigida BOCHICCHIO

Rapporteur (Potenza, Italie)

Pr. Gilles FAURY

Rapporteur (Grenoble)

Pr. Jean-Jacques LATAILLADE

Rapporteur (Paris)

Dr. Catherine LE VISAGE

Examineur (Nantes)

Pr. Sylvie RICARD-BLUM

Examineur (Lyon)

Dr. Clément FAYE

Membre invité (Montpellier)

Dr. Romain DEBRET

Directeur de thèse (Lyon)

Dr. Jérôme SOHIER

Directeur de thèse (Lyon)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé

Développement, caractérisation et potentiels thérapeutiques d'Elactiv', une protéine élastique biomimétique, inspirée de la tropoélastine humaine

Les peptides élastiques (ELP, *Elastin-like peptide*) sont d'excellents exemples de polymères biomimétiques récemment proposés en médecine régénérative, en particulier dans le domaine de l'ingénierie tissulaire des tissus mous (peau, vaisseaux sanguins, poumons...) pour lesquels la modélisation est complexe car l'instruction correcte des cellules nécessite une élasticité fonctionnelle. L'ajustement précis de la structure primaire des ELP peut moduler voire améliorer les propriétés physico-chimiques, structurales et fonctionnelles de la protéine native. De plus, la capacité des ELP à ajuster leurs caractéristiques physico-chimiques en réponse à des stimuli externes (température, pH), les définit comme des polymères intelligents. Ces polymères bioactifs offrent ainsi une large gamme d'applications très prometteuses encore très peu explorées dans les technologies d'ingénierie tissulaire et les systèmes d'administration de médicaments.

Dans ce travail de thèse, nous avons développé, caractérisé et évalué les potentiels thérapeutiques d'une protéine élastique synthétique, Elactiv', inspirée de la structure unique de la tropoélastine humaine, précurseur soluble de l'élastine. Elactiv' conserve les caractéristiques physico-chimiques (comportement thermosensible, propriétés d'auto-assemblage) et les fonctions biologiques de la protéine native (prolifération, différenciation et survie des fibroblastes dermiques et kératinocytes humains, sensibilité à la dégradation enzymatique). De plus, Elactiv' possède la particularité *in vitro* de s'incorporer dans les fibres élastiques néo-synthétisées par des fibroblastes dermiques sains, et d'induire la synthèse de tropoélastine fibrillaire par des fibroblastes pathologiques, syndrome de Williams-Beuren, qui ne synthétisent pas ou très peu de fibres élastiques. Un hydrogel formé exclusivement d'Elactiv' a permis d'accéder aux propriétés mécaniques de l'ensemble et de vérifier sa biocompatibilité *in vitro* et son innocuité et sa résorption *in vivo*. Enfin, l'association de la protéine Elactiv' aux dendrigrafts de poly(L-lysine), polymères synthétiques hautement fonctionnalisables, a permis de faire évoluer l'architecture de l'hydrogel vers un biomatériau hybride dans le but d'augmenter ses propriétés mécaniques et biologiques. Ainsi, les potentiels biomimétiques et thérapeutiques de la protéine Elactiv' en font un candidat prometteur pour la régénération des tissus mous.

DISCIPLINES: Biochimie et Biologie cellulaire

MOTS-CLES: Peptide élastique, tropoélastine humaine, fibres élastiques, fibroblastes, kératinocytes, Williams-Beuren, administration de médicaments, biomatériau.

LABORATOIRE: Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, UMR 5305 CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1, Equipe Fonctionnalité et Dynamique du Tissu Cutané, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France.

Summary

Development, characterization and therapeutic potential of Elactiv, a biomimetic elastic protein, inspired by the human tropoelastin

Elastin-like peptides are excellent examples of biomimetic polymers recently proposed in regenerative medicine, particularly for soft tissue engineering (skin, blood vessels, lung ...) for which modeling is a complex task requiring functional elasticity to instruct cells properly. Fine-tuning of ELP's primary structure can modulate or improve physicochemical, structural and functional properties of the native protein. In addition, the adjustment of ELP physicochemical characteristics through external stimuli (temperature, pH) defined them as intelligent polymers. These bioactive polymers thus provide a wide range of very promising applications in tissue engineering and drug delivery, although this has been under-explored until then.

In this thesis, we have developed, characterized and evaluated therapeutic potentials of Elactiv', a synthetic elastic protein inspired by the unique structure of the human tropoelastin, the soluble precursor of elastin. Elactiv' retains physicochemical characteristics (thermo-responsive behavior, self-assembly properties) and biological functions of the native protein (proliferation, differentiation and survival of human keratinocytes and dermal fibroblasts, susceptibility to enzymatic degradation). Besides, Elactiv' is able to incorporate into neo-synthesized elastic fibers by healthy dermal fibroblasts, and to induce fibrillar tropoelastin synthesis by pathological fibroblasts, Williams-Beuren syndrome, which do not synthesize or very few elastic fibres. A hydrogel formed exclusively of Elactiv' allowed to access to mechanical properties of the scaffold and to verify its biocompatibility *in vitro* and its safety and resorption *in vivo*. Finally, the association of Elactiv' protein to poly(L-lysine) dendrigrafts, highly functionalizable synthetic polymers, enabled to evolve the hydrogel's architecture to a hybrid biomaterial in order to increase its mechanical and biological properties for skin tissue engineering. Taken together, biomimetic and therapeutic potentials of Elactiv' protein make it a promising candidate for soft tissue regeneration.

KEYWORDS: Elastin-like peptide, human tropoelastin, elastic fibres, fibroblasts, keratinocytes, Williams-Beuren, drug delivery, biomaterial.

Remerciements

Ma thèse s'est effectuée au sein du laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique (LBTI), UMR5305, CNRS/UCBL et j'aimerais remercier en premier lieu son directeur, le Docteur **Bernard Verrier** pour sa sympathie, son écoute et son envie de créer une dynamique au sein de l'unité avec l'organisation des journées LBTI et des Happy Hours qui ont permis de contribuer à une très bonne entente entre tout le personnel, constituant un cadre de travail des plus agréable.

Je présente tous mes remerciements aux professeurs **Brigida Bochicchio**, **Gilles Faury** et **Jean-Jacques Lataillade** de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie également le Docteur **Catherine Le Visage** de siéger mon jury de thèse en tant qu'examineur.

J'aimerais remercier chaleureusement le Professeur **Sylvie-Ricard Blum** d'avoir accepté de présider ce jury. C'est une histoire qui se termine car vous avez été présente dans chacun de mes jurys pendant mon parcours universitaire et j'en suis très fière.

Un grand merci aux membres de mon Comité de Suivi de Thèse à savoir le Professeur **Stéphane Avril** et le Docteur **Bernard Verrier** pour leurs précieux conseils, les discussions que nous avons pu avoir et leurs encouragements.

J'adresse un très grand merci au Docteur **Pascal Sommer** pour m'avoir accueilli dans son équipe pendant mon année de master 2, et avec qui j'ai eu la chance de participer à l'Elastin Gordon Research Conference, qui restera ma plus belle expérience pendant la thèse malgré le stress et l'appréhension !! Merci d'avoir suivi, même à distance, mon évolution au sein de l'équipe et dans mon travail de thèse. Vous êtes une personne très sympathique avec beaucoup d'humour et pour qui j'ai un profond respect. Par contre, Pascal je suis désolée de vous dire que je ne suis toujours pas une adepte du vin rouge !

Je voudrais exprimer mes plus sincères remerciements et un grand respect à mes deux directeurs de thèse, les Docteurs **Romain Debret** et **Jérôme Sohier**, le Ying et le Yang, très différents mais à la fois très complémentaires. Je tenais à vous dire que vous formez vraiment un très bon duo qui m'a permis d'évoluer, de progresser et de prendre de l'assurance. Un grand merci à vous deux pour votre disponibilité, votre rigueur et la qualité de vos conseils scientifiques aussi bien d'un point de vue technique que pour la préparation des congrès et la rédaction (publication, manuscrit). Je voudrais maintenant m'adresser à chacun de vous. Un grand merci Romain pour ces quatre années de recherche passées sous ta direction. J'ai beaucoup appris grâce à toi et j'en suis très reconnaissante. J'ai apprécié ta rigueur scientifique. Merci pour ton soutien notamment pendant la fin de la rédaction et merci de m'avoir permis d'assister à plusieurs congrès pendant ma thèse. Jérôme, je voudrais te remercier d'avoir accepté de co-encadrer ma thèse avec Romain. Merci pour tes conseils scientifiques et moraux, pour le soutien et pour l'aide que tu m'as offert aux différents moments de ma thèse. Merci pour les sorties avec les autres étudiants qui resteront de bons souvenirs.

J'aimerais remercier les collaborateurs du projet ANR DHERMIC notamment l'entreprise COLCOM représentée par les Docteurs **Laurent Garrelly**, **Clément Faye**, **Fabien Granier** et **Barbara Maret**. Merci pour les bons moments que nous avons passés au cours des différentes réunions ANR à Lyon et à Montpellier. Merci pour votre sympathie, vos conseils et votre patience car vous avez toujours pris le temps de m'écouter pendant mes bilans et pour la préparation à l'Elastin Gordon Research Conference. Je suis bien consciente que pour des chimistes, mes présentations ont dû vous sembler très longues ! J'adresse un grand merci particulièrement au Docteur Clément Faye pour m'avoir initié aux DGL et à la technique du test ADECA, merci à toi pour ton aide, tes conseils et ta disponibilité. Je te remercie également d'avoir accepté l'invitation pour faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également notre deuxième collaborateur à savoir l'Ecole Centrale de Lyon représentée par le Docteur **Cyril Pailler-Mattei**. Merci Cyril pour ton aide et tes conseils dans l'analyse et l'interprétation des résultats concernant les tests d'indentation sur les hydrogels. Merci également pour le temps que tu m'as consacré au moment de la rédaction de la partie mécanique de mon manuscrit.

Un grand merci au Professeur **Claire Lethias** pour la réalisation des photos en microscopie électronique à transmission.

Merci à **Isabelle Zanella-Cléon** et **Frédéric Delolme** pour leur aide et leurs conseils concernant la spectrométrie de masse.

Je tenais à remercier également le Docteur **Aurélie Pagnon** de chez Novotec pour la préparation des échantillons, les colorations histologiques et l'acquisition des photos. Merci pour ta grande disponibilité malgré ton emploi du temps très chargé !

J'adresse toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements aux Docteurs **Dominique Sigaud-Roussel** et **Bérengère Fromy**, le girl power de l'équipe ! Un grand merci à vous deux pour votre sympathie, votre simplicité, votre soutien, vos conseils et les discussions toujours intéressantes que nous avons pu avoir. Dominique, tu as su reprendre la direction de notre équipe avec brio, intégrer toutes nos thématiques et faire en sorte de créer une harmonie entre les deux équipes, un challenge pas facile à relever !

J'aimerais souhaiter la bienvenue dans notre équipe au Professeur **Jérôme Lamartine** et à son étudiante **Charlotte Muthier**. Je te souhaite bonne chance Charlotte pour la suite de ta thèse et je suis très contente d'avoir partagée le même bureau que toi pendant les derniers mois de ma thèse. Dommage que tu n'aies pas intégré notre équipe plus tôt !

Je remercie très chaleureusement **Géraldine Aimond** pour sa sympathie, son soutien, ses anecdotes parfois très drôles ainsi que tous les bons moments que nous avons partagés pendant ces quatre années. Je te souhaite d'accomplir tes projets personnels et professionnels notamment la VAE ! Tu es une battante Géraldine, je crois en toi et je sais que tu vas réussir à aller au bout de tes ambitions.

Je souhaite également dire merci à **Audrey Josset-Lamaugarny**, **Jocelyne Vial** et **Valérie Orea**, les mamans de l'animalerie qui pouponnent tous les jours nos chères petites souris. Merci pour votre sympathie et pour les moments de convivialité pendant les repas. Un grand merci à toi Audrey pour m'avoir formée et transmis les bases lors de ma première manip souris. C'était une chouette expérience !

J'aimerais remercier **Ouahida Mzoughi** qui a été la gestionnaire de notre équipe pendant quatre ans. Merci Ouahida pour ta disponibilité, les nombreuses fois où tu m'as rendu service toujours avec le sourire et ta bonne humeur communicative. Merci pour ton soutien et tes encouragements à chaque instant de ma thèse. Nous avons passé de super moments ensemble et avec le reste de l'équipe, notamment avec notre chère petite Carine. Que de bons souvenirs ! Je souhaite bonne chance à **Muriel Rabilloud** qui a pris ta succession.

Je remercie également **Corinne Uberty** qui a assuré la relève juste après le départ de Ouahida, et que j'ai beaucoup embêtée avec l'envoi de mes énormes manuscrits. Un grand merci à toi Corinne pour ton aide et ta disponibilité.

Je souhaite bonne chance aux doctorantes **Anne-laure Begey**, **Noelle Remoué** et **Choua Ya**.

Merci à **Mylène Honorat**, **Lauriane Dury**, **Elisabeta Baiceanu**, **Lucia Gonzalez** et **Rachad Nasr**, mes collègues de la pièce de culture cellulaire pour leur bonne humeur au quotidien et les moments de convivialité pendant les manips. Merci aussi pour votre rigueur dans le ménage, ce qui n'était malheureusement pas le cas, à l'époque, dans notre équipe !

Merci à **Julien Resseguier** avec qui j'ai eu le plaisir de représenter les doctorants aux conseils LBTI. Je te souhaite bonne chance et bon courage pour la fin de ta thèse.

Je tenais également à remercier l'ensemble du **personnel LBTI et BMSSI** pour leur sympathie au quotidien et les échanges que nous avons pu avoir.

Je ne peux oublier de les remercier, mes trois compères **Carine Mainzer**, **Léa Moulin** et **Jérémy Boizot**. Merci à vous trois de m'avoir intégrée dans votre joyeuse troupe solidaire lorsque je suis arrivée en master 2. Quelle ambiance vous mettiez dans le labo (musique, rire, chant, cris, danse, insultes que personne d'autre n'a jamais prononcé et j'en passe...) et ce toujours dans la joie et la bonne humeur, n'en déplaise à nos voisins ! Hé oui, à cette folie s'ajoutait celle de **Marie Fatoux**, **Franck Peysselon**, **Sofiane Badaoui** et **Romain Salza** avec qui nous partagions les mêmes locaux. Merci à vous tous pour votre sympathie, votre joie de vivre, la bonne ambiance que vous mettiez dans le labo et pour toutes les soirées que nous avons passées au Carnegie et chez chacun d'entre nous. Merci pour votre soutien même après avoir quitté le labo.

A cette joyeuse bande, se sont ajoutés **Marie-Sophie Nguyen-tu** et **Alfred Quillon**. Merci à toi Marie-Sophie pour ta bonne humeur communicative, ton BONJOUR du matin qui donnait la pêche et tous les bons moments que nous avons passés dans le labo et notre bureau à rigoler avec Carine. Je te remercie pour tous les précieux conseils que tu as pu me donner et pour tes encouragements et ton soutien même depuis Londres.

Merci à notre petit génie Alfred qui après avoir fait le tour du monde, s'en est allé vers de nouvelles aventures, pas des plus faciles mais rien ne lui fait peur (Ah si certaines tenues vestimentaires comme pourront en témoigner Carine et Marie-Sophie !). Je te souhaite beaucoup de réussite et pense à donner des nouvelles « croustillantes » à tes vieilles copines.

Un grand merci à nos deux brésiliennes préférées, **Priscila Falagan Lotsch** et **Nathalia Balthazar Martins** pour leur sourire, leur joie de vivre et leur bonne humeur au quotidien. Merci Priscila pour les super moments que nous avons passés ensemble et pour ton soutien même depuis les Etats-Unis où tu vis maintenant avec Raphaël !

Merci Nathalia pour ta sympathie et les discussions que nous avons pu avoir. Dommage que tu sois arrivée pendant ma troisième année de thèse car j'étais très occupée. Je te souhaite bonne chance pour tes deux dernières années de thèse qu'il te reste à faire au Brésil.

Je remercie également nos deux masters 2 **Julien Deschaintre** et **Benjamin Ducharne** qui ont partagé ma dernière année de thèse et que j'ai sûrement dû traumatiser avec le ménage et l'organisation du laboratoire et de la pièce culture. Merci à vous deux pour votre sympathie, vous m'avez fait beaucoup rire même si j'ai dû migrer au 4^{ème} étage pour des raisons de concentration. Je vous souhaite bonne chance dans vos projets.

Merci à **Marlène Hanser**, master 1, qui a passé deux mois avec nous et que j'ai eu la chance d'encadrer sur une partie des manips Williams-Beuren. Merci à toi pour ta rigueur et ton dynamisme. C'était une très belle expérience !

Je voudrais maintenant dire un immense merci à **mes parents** pour m'avoir soutenue et encouragée dans mes choix et pour avoir toujours cru en moi malgré la distance. Mais chez les Lorion, la distance n'est plus un problème tant qu'il y a le téléphone! Hé oui, nous avons et nous allons encore passer de nombreuses heures au téléphone. Merci de m'avoir permis de faire mes études à Lyon et d'avoir toujours été là pour moi. Je profite de cette occasion pour exprimer toute l'admiration que j'ai pour vous. Tiphaine et moi avons beaucoup de chance d'avoir des parents aussi aimants, compréhensifs et ouverts d'esprit que vous. La liberté que vous nous avez donnée nous a toujours permis d'aller au bout de nos ambitions personnelles et professionnelles.

Et je garde le meilleur pour la fin, **Slah**. Merci de partager ma vie depuis toutes ces années. Merci de m'avoir encouragée à faire une thèse, sans toi je ne serai pas arrivée jusque-là, tu me portes vers le haut ! Un immense merci pour ton soutien indéfectible au quotidien, les longues discussions pour me remonter le moral dans les moments difficiles de ma thèse. J'ai beaucoup de chance de t'avoir car tu me donnes la force et le courage d'affronter n'importe quelle situation. Merci !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	16
Liste des tableaux	22
Liste des figures.....	24
INTRODUCTION	29
Introduction générale	30
I. Les fibres élastiques	31
I.1 La fibre élastique	31
I.2. Organisation des fibres élastiques	33
II. Synthèse et structure de la tropoélastine humaine	42
II.1. Synthèse de la tropoélastine	42
II.2. Structure de la tropoélastine	45
III. La tropoélastine humaine, une molécule biologiquement active	52
III.1. Les sites d'adhésion	52
III.2. Les réponses cellulaires	55
IV. Capacité d'organisation de la tropoélastine humaine : assemblage des fibres élastiques	59
IV.1. Sécrétion de la tropoélastine	60
IV.2. La coacervation.....	60
IV.3. Dépôt sur les microfibrilles.....	69
IV.4. Réticulation.....	69
V. Propriétés mécaniques de la tropoélastine humaine et de l'élastine insoluble	74
V.1. Les propriétés mécaniques de la tropoélastine humaine	74
V.2. Les modèles d'élasticité	75
VI. Pathologies génétiques dues à un déficit en élastine	78
VI.1. Sténose supra valvulaire aortique	78
VI.2. Syndrome de Williams-Beuren.....	79
VI.3. Le cutis laxa autosomique dominant de classe 1	80
VII. Altération des tissus normaux adultes	82
VII.1. Les fibres élastiques dans les tissus âgés.....	82
VII.2. Les fibres élastiques dans le processus de cicatrisation	87
VIII. Les peptides élastiques	92
VIII.1. Avantages des peptides élastiques sur la tropoélastine humaine	92
VIII.2. Les hydrogels ELP	101

VIII.3. Applications des ELP.....	103
BUT DU TRAVAIL	109
MATERIELS & METHODES	111
I. Synthèse de la protéine élastique Elactiv'	112
I.1. Clonage du gène Elactiv'	112
I.2. Production Elactiv' en système procaryote	121
I.3. Purification par la méthode d'Inverse Transition Cycling (ITC).....	121
II. Caractérisations physico-chimiques de la protéine Elactiv'	124
II.1. Spectroscopie par dichroïsme circulaire.....	124
II.2. Caractérisation thermique : Diffusion Dynamique de la Lumière	126
II.3. Modèle d'auto-assemblage <i>in vitro</i> des molécules Elactiv' : techniques de microscopie électronique.....	129
III. Caractérisation de la protéine Elactiv' comme support pour la culture 2D de fibroblastes dermiques humains	133
III.1. Les fibroblastes dermiques humains	133
III.2. Viabilité et prolifération des fibroblastes en présence d'Elactiv': test CyQuant®	133
III.3. Etudes des sites d'interactions de la protéine Elactiv' avec les fibroblastes : test d'adhésion.....	134
III.4. Influence de la protéine Elactiv' sur la différenciation myofibroblastique.....	136
III.5. Influence de la protéine Elactiv' sur la sécrétion des gélatinases matricielles : zymographie.....	137
III.6. Etude de la dégradation d'Elactiv' par les métalloprotéases matricielles	138
III.7. Analyse protéique à partir de fibroblastes en western-blot.....	139
III.8. Incorporation de la protéine Elactiv' dans les fibres élastiques néo-synthétisées.....	140
IV. Caractérisation de la protéine Elactiv' comme support pour la culture 2D de kératinocytes humains	142
IV.1. Les kératinocytes primaires humains.....	142
IV.2. Etude du potentiel progéniteur des kératinocytes (<i>Colony Forming Efficiency</i>).....	143
IV.3. Etude de la différenciation précoce des kératinocytes	143
IV.4. Analyse de l'expression génique	144
V. Application de la protéine Elactiv' dans le syndrome de Williams-Beuren	147
V. 1. Les souches de fibroblastes des patients Williams-Beuren.....	147
V. 2. Induction d'un dépôt fibrillaire de tropoélastine dans les cellules Williams-Beuren .	147
V. 3. Profil d'expression génique des cellules Williams-Beuren traitées avec Elactiv'	148
VI. Hydrogel Elactiv'	149

VI.1. Conception de l'hydrogel Elactiv' réticulé par la génipine	149
VI.2. Tests mécaniques de micro-indentation.....	149
VI.3. Viabilité des fibroblastes cultivés sur l'hydrogel Elactiv': test Live/Dead.....	153
VI.4. Implantation des hydrogels Elactiv' en sous-cutanée chez la souris.....	154
VI.5. Techniques d'histologie.....	156
VII. Les dendrigrafts de poly(L-lysine) : DGL	157
VII.1. Caractérisation des surfaces greffées de DGL par microscopie à force atomique	158
VII.2. Caractérisation des DGL comme support pour la culture 2D de fibroblastes dermiques humains	160
VIII. Etude de l'assemblage de l'unité hybride	163
VIII.1. Test ADECA « <i>Amino Density Estimation by Colorimetric Assay</i> ».....	163
VIII.2. Contrôle du greffage par immuno-marquage	166
IX. Hydrogel composite Elactiv'/DGL-G3	170
IX.1. Conception de l'hydrogel.....	170
IX.2. Analyse mécanique dynamique (AMD)	171
IX.3. Implantation de l'hydrogel en sous-cutanée chez la souris	172
X. Analyses statistiques	173
RESULTATS	174
I.Synthèse et caractérisation d'une protéine élastique: Elactiv'	175
I.1 Conception et synthèse de la protéine Elactiv'	175
I.2. Caractérisation physico-chimique de la protéine Elactiv'	177
I.2.1. <i>Caractérisation biochimique</i>	177
I.2.2. <i>Spectroscopie par dichroïsme circulaire</i>	177
I.2.3. <i>Caractérisation thermique</i>	179
I.2.4. <i>Modèle d'auto-assemblage in vitro des molécules Elactiv'</i>	181
I.3. Caractérisation de la protéine Elactiv' comme support pour la culture 2D de fibroblastes dermiques humains sains	183
I.3.1. <i>Viabilité et prolifération des fibroblastes</i>	183
I.3.2. <i>Etude des sites d'interactions de la protéine Elactiv' avec les fibroblastes</i>	185
I.3.3. <i>Influence de la protéine Elactiv' sur la différenciation myofibroblastique</i>	187
I.3.4. <i>Influence de la protéine Elactiv' sur la sécrétion des gélatinases matricielles</i>	189
I.3.5. <i>Cinétique de dégradation de la protéine Elactiv' par les MMP-2 et MMP-12</i>	191
I.3.6. <i>Incorporation de la protéine Elactiv' dans les fibres élastiques néo-synthétisées</i>	193

I.4. Caractérisation de la protéine Elactiv' comme support pour la culture 2D de kératinocytes humains.....	196
II.Application de la protéine Elactiv' au syndrome de Williams-Beuren	200
II.1. Induction d'un dépôt fibrillaire de tropoélastine dans les cellules Williams-Beuren...	200
II.2. Profil d'expression génique des cellules Williams-Beuren traitées avec Elactiv'	205
III.Hydrogel Elactiv'	207
III.1. Structures réticulées de la protéine Elactiv'	207
III.2. Propriétés mécaniques	209
III.3. Viabilité des fibroblastes dermiques humains cultivés sur l'hydrogel Elactiv'	211
III.4. Implantation de l'hydrogel Elactiv' en sous-cutanée chez la souris	212
IV.Les dendrigrafts de poly(L-lysine) : DGL	214
IV.1. Caractérisation des DGL comme support pour la culture 2D de fibroblastes dermiques humains.....	214
<i>IV.1.1 Détermination de la valeur de l'IC50</i>	<i>214</i>
<i>IV.1.2. Caractérisation des surfaces greffées de DGL</i>	<i>215</i>
<i>IV.1.3. Prolifération des fibroblastes.....</i>	<i>217</i>
<i>IV.1.4. Adhérence et étalement des fibroblastes.....</i>	<i>218</i>
IV.2. Caractérisation des DGL comme support pour la culture 2D de kératinocytes humains	222
V.Etude de l'assemblage de l'unité hybride.....	224
VI.Hydrogel composite Elactiv'/ DGL-G3	234
VI.1. Propriétés mécaniques	234
VI.2. Morphologie des fibroblastes dermiques cultivés sur l'hydrogel composite.....	236
VI.3. Implantation de l'hydrogel composite en sous-cutanée chez la souris	236
DISCUSSION	239
I.Comparaison des propriétés physico-chimiques d'Elactiv' avec la TE et les ELP, liées à l'auto-assemblage et au caractère élastique	240
I.1. Structure et coacervation	240
I.2. Auto-assemblage multi-échelle	243
I.3. Intégration dans les fibres élastiques	244
II.Activités biologiques d'Elactiv'	247
II.1. Prolifération.....	247
II.2. Adhérence.....	248
II.3. Induction des MMP et dégradation	248
II.4. Morphologie cellulaire et différenciation myofibroblastique.....	250

III.Approche thérapeutique dans le syndrome de Williams-Beuren.....	253
III.1. Induction d'un dépôt fibrillaire de tropoélastine dans les cellules Williams-Beuren....	253
III.2. Profil d'expression génique des cellules Williams-Beuren traitées avec Elactiv'	255
IV.Approche en ingénierie tissulaire	257
IV.1. Les dendrigrafts de poly(L-lysine) : DGL.....	257
IV.2 Hydrogel composite Elactiv'-DGL	260
 CONCLUSION & PERSPECTIVES	 263
I.Conclusion	264
II.Perspectives.....	265
 COMMUNICATIONS	 270
 ANNEXES.....	 273
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 292

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

ADAMTS	<i>A Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin type-I</i>
ADAMTSL	<i>ADAMTS-like</i>
ADECA	<i>Amino Density Estimation by Colorimetric Assay</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFA	<i>Fixative AFA liquid</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AGE	<i>Advanced Glycation End products</i>
AMD	Analyse Mécanique Dynamique
AP	Activator Protein
APMA	Aminophénylmercurique
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BET	Bromure d'éthidium
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BPE	<i>Bovine Pituitary Extract</i>
BS3	<i>Disuccinimidyl suberate</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
cbEGF	<i>calcium-binding Epidermal Growth Factor</i>
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CLAD1	Cutis Laxa Autosomique Dominante de classe 1
CMLV	Cellules Musculaires Lisses Vasculaires
DC	Dichroïsme Circulaire
DGL	Dendrigraft de poly(L-lysine)
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	N,N-diméthylformamide
DNMT	ADN méthyltransférase

Liste des abréviations

DTT	Dithiothréitol
E*	Module réduit ou complexe d'Young
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBP	<i>Elastin Binding Protein</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELN	Elastine (gène)
ELP	<i>Elastin-Like Peptide</i>
ELR	<i>Elastin-Like Recombinamer</i>
ETD	<i>Electron Transfert Dissociation</i>
Fz/F _N	Force normale
FBLN5	Fibuline-5 (gène)
FBN1	Fibrilline-1 (gène)
FBN2	Fibrilline-2 (gène)
FGM	<i>Fibroblast Growth Medium</i>
GAG	Glycosaminoglycane
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HAT	Histone acétyltransférase
HCAEC	<i>Human Coronary Artery Endothelial Cells</i>
HCl	Acide chloridrique
HDAC	Histone désacétylase
HES	Hématéine/Eosine/Safran
HMT	Histone méthyltransférase
HRM-PCR	<i>High Resolution Melting-PCR</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hTE	Tropoélastine humaine recombinante
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IC50	Concentration inhibitrice médiane
IDP	<i>Intrinsically Disordered Protein</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL-1 β	Interleukine-1 β
iPS	<i>induced Pluripotent Stem cells</i>
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid

Liste des abréviations

ITC	<i>Inverse Transition Cycling</i>
IVL	Involucrine (gène)
K-10	Kératine-10 (gène)
kb	kilobase
kDa	Kilodalton
KGM2	<i>Keratinocyte Growth Medium 2</i>
KGM2 NS	<i>Keratinocyte Growth Medium 2 non supplémenté</i>
kPa	kilopascal
LAP	<i>Latency-Associated Peptide</i>
LB	<i>Luria Broth</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
LOX	Lysyl-oxydase
LOXL-1	Lysl-oxydase like-1
LTBP	<i>Latent TGF-β-Binding Protein</i>
LTGF- β	<i>Latent TGF-β</i>
MAGP	<i>Microfibril-Associated Glycoprotein</i>
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MetOH	Méthanol
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
mN	millinewton
MPa	Mégapascal
Neu-1	Neuraminidase-1
NF	<i>Nuclear Factor</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NHDF	<i>Normal Human Dermal Fibroblast</i>
NHK	<i>Normal Human Keratinocyte</i>
NHS-PEG-NHS	O,O'-Bis[2-(N-Succinimidyl-succinylamino)ethyl] polyéthylène glycol
NP-40	<i>Nonidet-P40</i>
P/S	Pénicilline/Streptomycine
p/v	poids/volume
PAF	Paraformaldéhyde
PAMAM	Polyamidoamine

Liste des abréviations

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline-Tween 20</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PG	Protéoglycane
PGCS	Protéoglycane à chondroïtine sulfate
pH	Potentiel Hydrogène
PLL	Poly-L-lysine linéaire
PPII	Polyproline II
PTFE	Polytétrafluoréthylène
PVA	Alcool polyvinylique
PVDF	Polyvinylidène fluoride
REG	Réticulum Endoplasmique Granuleux
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SANS	<i>Small Angle Neutron Scattering</i>
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
S-Gal	<i>Spliced-galactosidase</i>
SP	<i>Specificity Protein</i>
SVAS	<i>Supravalvular Aortic Stenosis</i>
SVF	Sérum de Veau Fœtal
SWB	Syndrome de Williams-Beuren
tan δ	Tangente delta
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline-Tween 20</i>
TE	Tropoélastine humaine
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TGM1	Transglutaminase-1 (gène)
TG-SDS	<i>Tris-Glycine-Sodium Dodecyl Sulfate</i>
THPC	<i>Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride</i>
THPP	<i>β-[tris(hydroxymethyl)phosphino]-propionic acid</i>

Liste des abréviations

TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRITC	Tétraméthylrhodamine
Tt	Température de transition
UV	UltraViolet
v/v	volume/volume
WB	Williams-Beuren
α -SMA	<i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>
β -APN	β -(γ -glutamyl)-aminopropionitrile

LISTE DES TABLEAUX

Liste des tableaux

Matériels & Méthodes

Tableau 1: Anticorps primaires utilisés pour les expériences de western-blot.	140
Tableau 2: Séquences des amorces utilisées, pour la PCR en temps réel, dans l'étude de la différenciation précoce des kératinocytes primaires humains en présence d'Elactiv'	145
Tableau 3: Souches de fibroblastes primaires utilisées pour l'étude de la pathologie Williams-Beuren	147
Tableau 4: Séquences des amorces utilisées, pour la PCR en temps réel, dans l'étude du profil d'expression génique des cellules WB traitées avec la protéine Elactiv'.	148

Résultats

Tableau 5: Validation de l'assemblage de l'unité hybride (DGL + NHS-C4-Maléimide + Elactiv') par un test ADECA	225
Tableau 6: Validation de l'assemblage de l'unité hybride (DGL + NHS-C4-Maléimide + Elactiv') avec greffage covalent des DGL-G3, par un test ADECA.....	228
Tableau 7: Validation de l'assemblage de l'unité hybride (DGL + NHS-C4-Maléimide + Elactiv'), par un test ADECA, avec comme tampons de greffage des tampons salins.....	229
Tableau 8: Validation de l'assemblage de l'unité hybride (DGL + NHS-C4-Maléimide + Elactiv'), par un test ADECA, avec comme tampons de greffage du PBS, Tween 0,1-1%. .	233

LISTE DES FIGURES

Liste des figures

Introduction

Figure 1: Représentation schématique d'une fibre élastique.	32
Figure 2: Organisation des fibres élastiques	32
Figure 3: Représentation schématique des domaines de la fibrilline-1	34
Figure 4: Structures des microfibrilles et interactions avec les protéines matricielles.	36
Figure 5: Représentation schématique des domaines de LTBP-1	38
Figure 6: Représentation schématique des protéoglycanes.....	38
Figure 7: Représentation schématique des domaines des fibulines 3-5	40
Figure 8: Représentation schématique des domaines des ADAMTS	40
Figure 9: Représentation schématique des domaines de l'Emiline-1	42
Figure 10: Carte des domaines de la tropoélastine humaine.	43
Figure 11: Structure tertiaire de la tropoélastine humaine en solution.	49
Figure 12: Les récepteurs qui interagissent avec la tropoélastine humaine favorisant l'adhérence cellulaire.	53
Figure 13: Orientation moléculaire de la tropoélastine en fonction de l'hydrophobicité de la surface.	57
Figure 14: Modèle classique de l'assemblage des fibres élastiques.....	60
Figure 15: Etapes d'auto-assemblage <i>in vitro</i> de la tropoélastine humaine.....	62
Figure 16: Formation des liaisons croisées de l'élastine.....	71
Figure 17: Schéma récapitulatif de la formation des fibres élastiques.....	73
Figure 18 : Expérience d'étirement, par microscopie à force atomique, sur une molécule de tropoélastine.	75
Figure 19: Modèles structuraux de l'élastine.	77
Figure 20: La matrice extracellulaire des artères jeunes et ses modifications au cours du vieillissement.....	84
Figure 21: Dégradation des fibres élastiques au cours du vieillissement cutané.	86
Figure 22: Les étapes de cicatrisation de la peau d'un adulte.	89
Figure 23: Applications des ELP.	93
Figure 24: Purification des ELP par la technique d'ITC.....	96
Figure 25: Stent recouvert d'un hydrogel ELR bioactif pour l'ingénierie vasculaire.....	101

Figure 26: Schéma de principe de la perte d'eau provenant de la contraction de l'hydrogel ELP, suite à l'augmentation de la température.....	103
Figure 27: Représentation schématique de la technique d'électrospray pour la préparation de nanoparticules d'ELP sphériques encapsulant de la doxorubicine..	105
Figure 28: Formation de structures micellaires ELP.....	105

Matériels & Méthodes

Figure 29: Carte de restriction du vecteur pUC57-Elactiv'.	113
Figure 30: Structure du vecteur pET30a	114
Figure 31: Profil de digestion du vecteur pUC57-Elactiv' par le couple d'enzyme de restriction <i>NdeI/SalI</i>	115
Figure 32: Profil de digestion du plasmide pET30a natif et du vecteur recombinant pET30a-Elactiv' par l'enzyme de restriction <i>EcoRV</i>	118
Figure 33: Origine de l'effet observé en spectroscopie de dichroïsme circulaire.	125
Figure 34: Spectres de dichroïsme circulaire des structures secondaires de protéines.	125
Figure 35: Relation de Stokes-Einstein qui lie le coefficient de diffusion mesuré par diffusion dynamique de la lumière et la taille des molécules.	126
Figure 36: Variation hypothétique de l'intensité diffusée par des petites et des grosses molécules en DLS	127
Figure 37: Exemples de corrélogrammes, obtenus en DLS, pour une population de petites et de grosses molécules en suspension.....	128
Figure 38: Protocole de coloration négative pour la microscopie électronique à transmission.	130
Figure 39 : Schématisation d'un zymogramme représentant les activités gélatinolytiques des proMMP-2 et -9 ainsi que leurs formes actives.	138
Figure 40: Représentation schématique du dispositif expérimental de micro-indentation ...	150
Figure 41: Courbe d'indentation obtenue avec un matériau viscoélastique.....	150
Figure 42: Contact élastique entre un échantillon souple et un indenteur sphérique indéformable.....	151
Figure 43: Analyse énergétique de la courbe d'indentation..	152
Figure 44: Schéma d'implantation des hydrogels Elactiv' en sous-cutanée chez la souris. ..	155
Figure 45: Caractéristiques et illustration de la structure arborescente des dendrigrafts de poly(L-lysine) au cours des générations successives.	157

Figure 46 : Schéma de principe du microscope à force atomique fonctionnant en mode « tapping ».	159
Figure 47: Schéma représentant l'assemblage de l'unité hydride (DGL-G3 + NHS-C4-maléimide + Elactiv').	163
Figure 48: Principe du Test ADECA « <i>Amino Density Estimation by Colorimetric Assay</i> ».	164
Figure 49: Greffage par immuno-marquage de l'unité hybride (DGL-G3 + NHS-C4-maléimide + Elactiv').	168
Figure 50: Réaction entre le N-(5-fluorescéine) maléimide et la protéine Elactiv'.	168
Figure 51: Schéma d'implantation des hydrogels composites poreux Elactiv'/DGL-G3 en sous-cutanée chez la souris.	171

Résultats

Figure 52: Conception et synthèse de la protéine Elactiv'.	176
Figure 53: Analyse de la protéine Elactiv' par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).	178
Figure 54: Spectres de dichroïsme circulaire de la protéine élastique Elactiv' et de la tropoélastine humaine recombinante (hTE) enregistrés à 20°C, 40°C et 60°C dans du PBS, pH 7,4.	178
Figure 55: Caractérisation thermique de la protéine Elactiv'.	180
Figure 56: Modèle d'auto-assemblage <i>in vitro</i> des molécules Elactiv'.	182
Figure 57: Prolifération des fibroblastes dermiques humains normaux en présence d'Elactiv'.	184
Figure 58: Etude des sites d'interaction d'Elactiv'.	186
Figure 59: Influence de la protéine Elactiv' sur la morphologie des fibroblastes dermiques humains.	188
Figure 60: Influence de la protéine Elactiv' sur la sécrétion des gélatinases matricielles.	190
Figure 61: Cinétique de dégradation de la protéine Elactiv' par la MMP-2.	191
Figure 63: Incorporation de la protéine Elactiv' dans les dépôts fibrillaires de tropoélastine néo-synthétisés par les fibroblastes dermiques humains normaux.	194
Figure 64: Effet de la protéine Elactiv' sur le potentiel progéniteur des Kératinocytes primaires humains.	197
Figure 65: Suivi de l'induction de la différenciation précoce dans un modèle de culture à confluence de kératinocytes primaires humains en présence de la protéine Elactiv'.	199

Figure 66: Traitement des cellules Williams-Beuren et leur contrôle apparié avec la protéine Elactiv' à J5 post-confluence.	201
Figure 67: Traitement des cellules Williams-Beuren et leur contrôle apparié avec la protéine Elactiv' à confluence.	203
Figure 68: Rôle de la protéine Elactiv' dans le dépôt fibrillaire de TE par les cellules Williams-Beuren.	204
Figure 69: Analyse du profil d'expression génique des cellules Williams-Beuren traitées avec la protéine Elactiv' par PCR en temps réel.	206
Figure 70: MEB des structures Elactiv' réticulées par de la génipine.	208
Figure 71: Tests d'indentation réalisés sur l'hydrogel Elactiv' réticulé par la génipine, en immersion totale dans du PBS.	210
Figure 72: Viabilité des NHDF cultivés sur l'hydrogel Elactiv' réticulé par de la génipine.	214
Figure 73: Implantation des hydrogels Elactiv' réticulés par de la génipine en sous-cutanée chez la souris pendant 4 semaines.	214
Figure 74: Test de viabilité des fibroblastes dermiques humains en présence des DGL (G2-G4) et de la PLL, réalisé en utilisant le réactif UptiBlue.	215
Figure 75: Analyses des surfaces greffées de DGL.	216
Figure 76: Suivi de la prolifération des fibroblastes dermiques humains sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL (G2-G4) et la PLL, en utilisant le réactif UptiBlue.	218
Figure 77: Adhérence précoce et étalement des fibroblastes dermiques humains sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL (G2-G4) et la PLL.	219
Figure 78: Système d'adhérence actif des fibroblastes dermiques humains sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL (G2-G4) et la PLL.	221
Figure 79: Effet des DGL-G3 sur le potentiel progéniteur des Kératinocytes primaires humains.	223
Figure 80: Schéma représentant l'assemblage de l'unité hydride (DGL-G3 + NHS-C4-maléimide + Elactiv').	226
Figure 81: Etalement des fibroblastes dermiques humains sur l'unité hybride (DGL-G3 + NHS-C4-maléimide + Elactiv') observé par microscopie à épifluorescence.	227
Figure 82: Validation du greffage de la protéine Elactiv' sur le groupement maléimide du NHS-C4 maléimide par immunomarquage.	230
Figure 83: Validation du greffage de la protéine Elactiv' sur le groupement maléimide du NHS-C4 maléimide en utilisant un fluorophore, le N-(5-fluoresceinyl) maléimide.	232

Figure 84: Analyses mécaniques dynamiques de l'hydrogel composite Elactiv'/ DGL-G3 contenant 1% en masse d'Elactiv', avec une amplitude de déplacement dynamique définie à 10% et à 100 Hz.	235
Figure 85: Observation du cytosquelette d'actine, par microscopie à épifluorescence, des fibroblastes dermiques humains cultivés sur l'hydrogel composite poreux Elactiv'/ DGL-G3.	236
Figure 86: Implantation de l'hydrogel composite Elactiv'/ DGL-G3 poreux en sous-cutanée chez la souris pendant 3 semaines	238

Discussion

Figure 87: Echelle du module d'élasticité (module d'Young E^*) des tissus	244
Figure 88: Mécanisme d'incorporation d'Elactiv' dans les fibres élastiques néo-synthétisées par les fibroblastes dermiques sains.	246
Figure 89: Importance des propriétés biomécaniques du microenvironnement dans le développement des tissus mous.....	250
Figure 90: Modèle de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes sous l'action du TGF- β en fonction de la rigidité du support.....	251

Perspectives

Figure 91: Connectivité moléculaire de la matrice extracellulaire au noyau.	267
---	-----

INTRODUCTION

Introduction générale

Au sein des tissus biologiques, les cellules forment un réseau organisé et entouré de matrice extracellulaire (MEC). La MEC joue un rôle fondamental dans l'homéostasie et le développement des tissus, notamment par la densité, le ratio et le degré de réticulation des macromolécules qui la composent. Ainsi, les glycosaminoglycanes et protéoglycanes interviennent dans la viscosité des tissus par leur fort pouvoir hygroscopique, permettant leur hydratation. Les fibres élastiques permettent, quant à elles, les propriétés d'extension et de retour élastique des tissus, contrairement aux fibres de collagène qui elles résistent bien à la traction et jouent un rôle structural très important. De ce microenvironnement, remanié en permanence suite à différents processus cellulaires, émanent des signaux biochimiques (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines), mécaniques (forces de traction et de tension, rigidité) et topographiques (architecture, morphologie). Ces stimuli, convertis en signaux intracellulaires, influencent le comportement des cellules à travers les interactions cellules/MEC, et jouent un rôle essentiel dans un grand nombre de processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la survie et la morphologie. En conséquence, les interactions cellules/MEC contribuent à de nombreux processus physiologiques (croissance, remodelage du tissu lésé) et pathologiques (fibrose caractérisée par une synthèse excessive de MEC ou progression tumorale entraînant, au niveau local, un remodelage matriciel). A ce titre, le microenvironnement cellulaire peut se présenter comme une cible permettant de lever des verrous thérapeutiques et constituer une source importante de marqueurs de diagnostics (vieillesse, maladies génétiques, infection, cancer...). De plus, les études menées sur la composition et l'architecture du microenvironnement cellulaire ont conduit au développement de matrices biomimétiques dans le but de créer des modèles alternatifs de criblages de molécules bioactives mais également, dans certains cas, pour l'optimisation de procédés en médecine régénérative. Le biomimétisme est un enjeu majeur en médecine régénérative, en particulier dans le domaine de l'ingénierie tissulaire des tissus mous (la peau, les vaisseaux sanguins, les poumons...) pour lesquels la modélisation est complexe car l'instruction correcte des cellules nécessite une élasticité fonctionnelle. D'où l'importance de la microélasticité et des propriétés potentiellement thérapeutiques de l'environnement cellulaire conférés dans les tissus natifs par les fibres élastiques.

I. Les fibres élastiques

I.1 La fibre élastique

Les fonctions physiologiques de nombreux tissus humains sont dépendantes de leurs propriétés élastiques. Les fibres élastiques sont des composants essentiels de la matrice extracellulaire (MEC), responsables de la résilience des tissus des vertébrés (Debelle and Tamburro 1999). Ces structures sont trouvées en abondance dans les tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques nécessitant des cycles répétés d'extension et de retour à leur structure d'origine tels que la peau, les artères, les poumons, les valves cardiaques ou encore les ligaments (Kielty, Sherratt *et al.* 2002). La disposition des fibres élastiques leur confère des propriétés rhéologiques qui diffèrent selon le tissu considéré. Ces propriétés rhéologiques sont principalement assurées par l'élastine qui représente 50% de la masse sèche des ligaments, 30% de l'aorte thoracique et des grands vaisseaux, 10% des valves (Bashey, Torii *et al.* 1967), 7% des poumons et 3% de la peau (Vrhovski and Weiss 1998). Bien que l'élastine ne représente parfois qu'un faible pourcentage de la MEC, son rôle est primordial au cours des changements dynamiques de par ses propriétés intrinsèques assurant une compétence élastique et un retour d'énergie.

Les fibres élastiques sont synthétisées au cours de l'élastogenèse qui désigne l'ensemble des processus intra- et extracellulaires conduisant à l'assemblage des fibres élastiques fonctionnelles. La genèse des fibres élastiques a lieu durant les stades précoces du développement, et atteint un pic à la naissance. Ce processus ralentit jusqu'à la puberté et devient quasi nul à l'âge adulte (Uitto, Christiano *et al.* 1991). La synthèse des fibres élastiques implique le dépôt de tropoélastine, précurseur soluble de l'élastine, sur une matrice préformée de microfibrilles, riches en fibrillines. Les fibres élastiques matures sont donc issues d'un assemblage supramoléculaire, constitué d'une enveloppe externe microfibrillaire et d'un cœur interne d'élastine réticulée et insoluble (Ramirez 2000) (**Figure 1**). L'architecture des fibres élastiques matures est complexe et dépend du tissu, reflétant ainsi la fonction biologique du tissu considéré. Les fibres élastiques peuvent se présenter sous forme de fibres individualisées dans la peau, de fibres entrelacées dans les ligaments, de lamelles élastiques dans l'aorte, de minces fibres ramifiées dans le poumon ou bien en nid d'abeille dans le cartilage ou les valves (Scott and Vesely 1995) (Mithieux and Weiss 2005) (**Figure 2**).

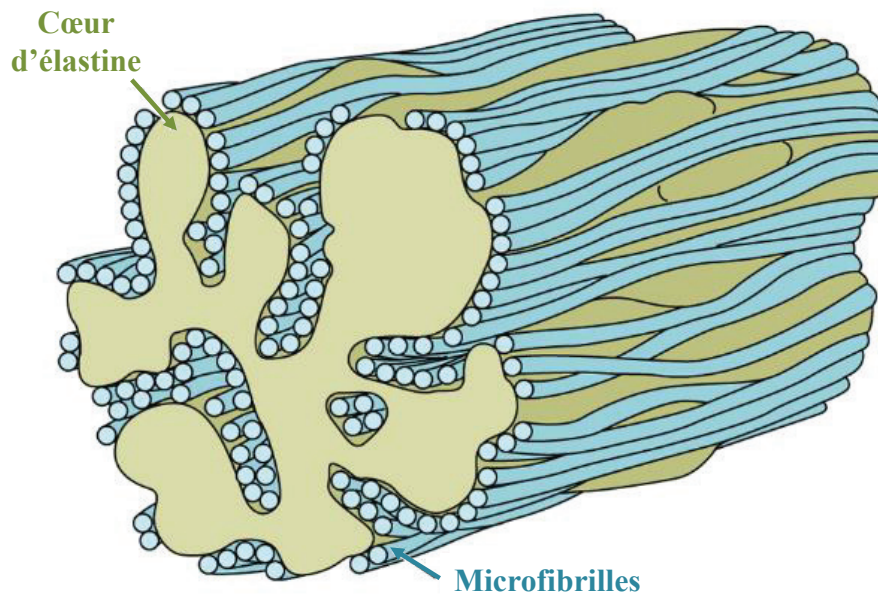


Figure 1: Représentation schématique d'une fibre élastique. Les microfibrilles entourent le cœur d'élastine insoluble et réticulée (adaptée de Leslie P. Gartner, James L. Hiatt, chapter 4 Color Textbook of Histology, 3rd ed, 2007).

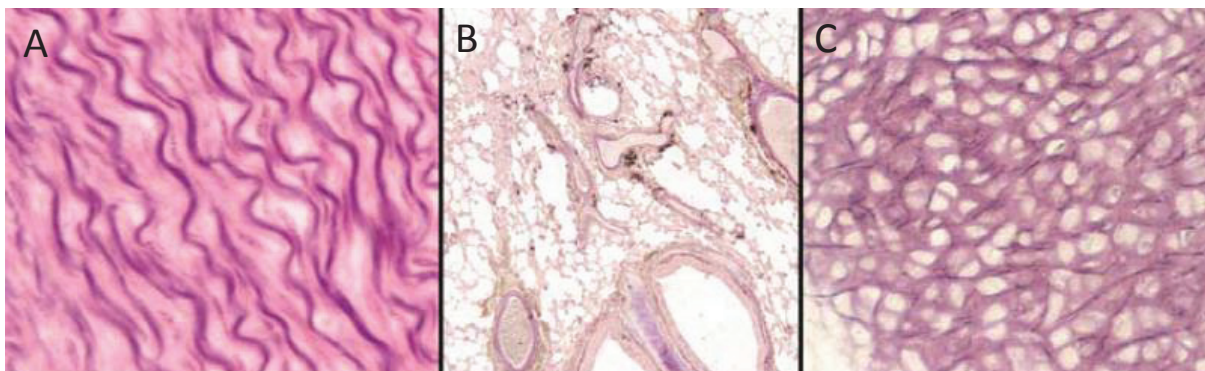


Figure 2: Organisation des fibres élastiques en lamelles élastiques dans l'aorte (A), en minces fibres ramifiées dans le poumon (B) et en nid d'abeilles dans le cartilage (C) (Mithieux and Weiss 2005).

Par ailleurs, les fibres élastiques peuvent avoir des appellations différentes selon la proportion d'élastine présente dans ces fibres. Il est ainsi possible de différencier, les fibres possédant un faible taux d'élastine et les fibres constituées de plus de 90% d'élastine ; elles sont respectivement dénommées fibres oxytalanes, fibres d'élaunine et fibres élastiques matures (Sherratt 2009).

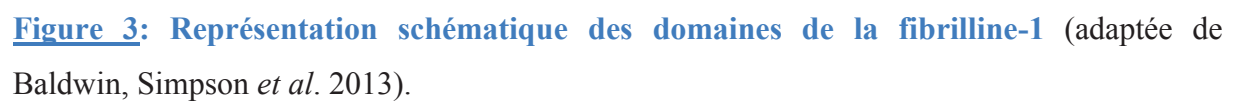
I.2. Organisation des fibres élastiques

I.2.1. Les microfibrilles

Les microfibrilles s'associent à l'élastine et participent à la formation de la fibre élastique mature. Elles constituent une charpente tridimensionnelle sur laquelle les monomères de tropoélastine se déposent et s'alignent avant de former une liaison covalente avec la fibre en cours de maturation, suite à l'action des lysyl oxydases (LOX) (Kielty, Baldock *et al.* 2002). Les microfibrilles sont principalement constituées de fibrillines qui s'associent avec un grand nombre de molécules.

I.2.1.1. Les fibrillines

Chez l'Homme, il existe trois isoformes de la fibrilline codées par trois gènes différents : les fibrilline-1, -2 et -3. Ces gènes sont situés respectivement sur les chromosomes 15, 5 et 19. Chaque fibrilline voit son expression varier au cours de la vie. L'expression de la fibrilline-3 se limite aux stades précoces du développement fœtal, alors que les fibrillines -1 et -2 sont exprimées conjointement pendant les stades embryonnaires et fœtaux. Seule la fibrilline-1 voit son expression perdurer au-delà du stade post-natal dans un contexte sain. Les trois isoformes de la fibrilline présentent entre elles une forte homologie au niveau des séquences d'acides aminés (~ 60%), malgré la localisation différente de leur gène (Hubmacher, Tiedemann *et al.* 2006). Les fibrillines sont des glycoprotéines de 350 kDa, composées d'une répétition de domaines protéiques. Chaque fibrilline possède 43 domaines EGF qui lient le calcium (domaines cbEGF, pour *calcium-binding Epidermal Growth Factor*) (**Figure 3**). Ces domaines permettent à la protéine, en présence de calcium, d'adopter une structure en bâtonnet.



Les fibrillines possèdent cinq domaines EGF-like et sept domaines de liaison du TGF- β (pour *Transforming Growth Factor*), appelés domaines TB, qui s'intercalent avec les domaines cbEGF et présentent huit résidus de cystéine, d'où leur appellation domaine 8-cys. Le quatrième domaine TB (TB4) contient la séquence Arg-Gly-Asp (RGD), qui est un motif de liaison aux intégrines. L'expression des fibrilline-1 -2 et -3 est générée dans le développement des vaisseaux sanguins, des valves cardiaques (Votteler, Berrio *et al.* 2013), du cartilage, des os et des poumons. Néanmoins, des différences existent entre chaque tissu ; par exemple, la fibrilline-1 est plus exprimée dans le derme alors que la fibrilline-2 est majoritairement présente au cours du développement des nerfs périphériques et absente dans les valves à partir de l'adolescence. Quant à la fibrilline-3, elle est présente lors du développement du cartilage, du périchondre et des bronches (Sabatier, Miosge *et al.* 2011). La fibrilline-2 peut servir de matrice de soutien à la fibrilline-1 dans la formation des fibres élastiques. En effet, elle est capable de se lier à la fibrilline-1 par sa région N-terminale (Charbonneau, Jordan *et al.* 2010). Bien que rarement détectée dans la peau des adultes, l'expression de la fibrilline-2 peut augmenter au cours de la cicatrisation des plaies et dans la sclérose (Brinckmann, Hunzelmann *et al.* 2010).

1.2.1.2. Les molécules associées aux microfibrilles

L'analyse ultrastructurale des microfibrilles a permis de les visualiser sous la forme de filaments perlés avec une période de 56 nm (**Figure 4**). Cette apparence très complexe des microfibrilles est due à l'organisation spécifique de ses différents constituants, impliquant la présence de plusieurs protéines partenaires à la fibrilline (Kielty, Baldock *et al.* 2002).

Les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGPs pour *Microfibril-Associated Glycoprotein-1*), sont de petites glycoprotéines associées à la structure des microfibrilles. Il en existe cinq isoformes (MAGP-1 à -5). Deux isoformes (MAGP-1 (~31 kDa) et MAGP-2 (~25 kDa)) sont plus particulièrement décrites pour jouer un rôle dans l'assemblage des microfibrilles et participer au maintien de leur intégrité structurale (Baldwin, Simpson *et al.* 2013).

MAGP-1 possède une région N-terminale acide, riche en prolines qui comporte un regroupement de glutamine, et une région C-terminale constituée de 13 résidus de cystéine. MAGP-1 peut lier à la fois la tropoélastine et les fibrillines. L'interaction entre MAGP-1 et la région N-terminale de la fibrilline-1 est impliquée dans le processus d'assemblage des microfibrilles.

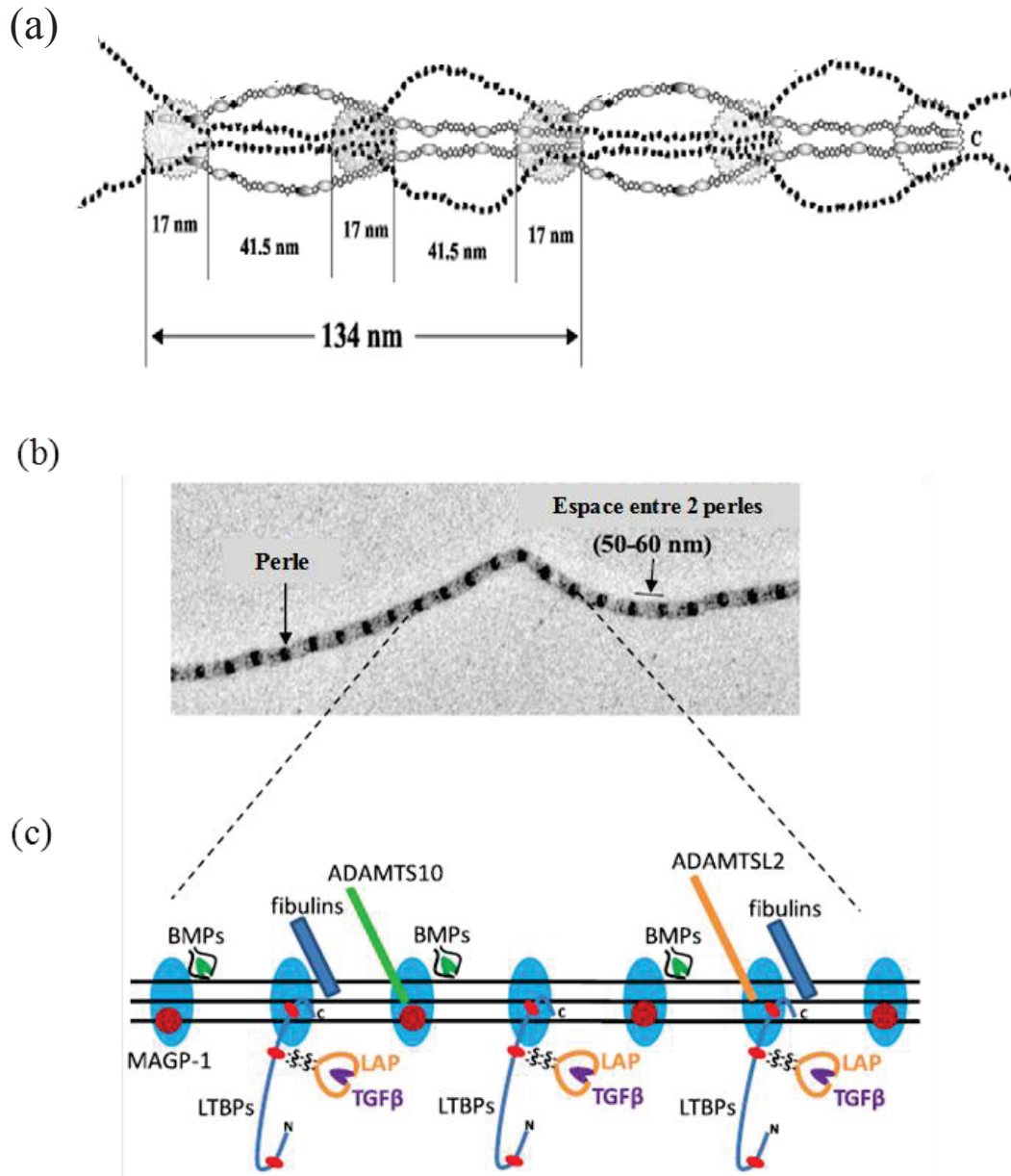


Figure 4: Structures des microfibrilles et interactions avec les protéines matricielles.

(a) Modèle proposé pour la structure des microfibrilles, composé de molécules de fibrillines-1 parallèles disposées en quinconce, avec la moitié de leurs extrémités N- et C-terminales à l'extérieur des microfibrilles (Vakonakis and Campbell 2007). (b) Observation par microscopie électronique de la structure microfibrillaire. Les microfibrilles isolées apparaissent comme des filaments perlés de 10 à 12 nm de diamètre avec une périodicité moyenne de 50 à 60 nm. (c) Interactions des microfibrilles avec les protéines matricielles dont MAGP-1 (*Microfibril-Associated Glycoprotein-1*), la famille des LTBP (*latent TGF-β-binding proteins*), la famille des ADAMTS (*a disintegrin-like and metalloprotease (repolyisin-type) with thrombospondin type-I motif*), les fibulines. Les microfibrilles interagissent également avec des facteurs de croissance comme le TGF-β (Transforming Growth Factor) et les BMP (*Bone Morphogenic Proteins*) (adaptée de Jensen, Robertson *et al.* 2012).

La liaison de MAGP-1 à la tropoélastine stabilise l'interaction entre les microfibrilles et l'élastine dans les étapes tardives de l'élastogénèse (Jensen, Reinhardt *et al.* 2001). Par conséquent, MAGP-1 participe principalement à l'intégrité structurale des microfibrilles (Segade, Trask *et al.* 2002).

Outre sa région centrale riche en cystéine, l'isoforme MAGP-2 est riche en résidus sérine et thréonine et contient une séquence RGD impliquée dans la liaison aux intégrines telles que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Kielty, Sherratt *et al.* 2002). MAGP-2 peut interagir avec les fibrilline-1 et -2, en s'associant de façon covalente et périodique avec les microfibrilles isolées dans de nombreux tissus. De plus, MAGP-2 peut stimuler l'assemblage des fibres élastiques, probablement en ciblant l'élastine sur les microfibrilles. Par conséquent, MAGP-2 participe à l'assemblage des microfibrilles et des fibres élastiques (Lemaire, Bayle *et al.* 2007).

Les protéines de la famille « latent TGF- β -binding proteins » (LTBP) sont de grandes glycoprotéines extracellulaires avec une structure en multi-domaines, qui présente des similitudes avec les fibrillines, comprenant des domaines cbEGF et TB, avec un domaine N-terminal riche en cystéine (**Figure 5**). Les LTBP sont exprimées dans de nombreux tissus dont le cœur, le placenta, le poumon, le rein ou encore le muscle squelettique (Todorovic, Jurukovski *et al.* 2005). Ils fixent le TGF- β et permettent ainsi de réguler sa disponibilité. Les LTBP présentent quatre isoformes. Seule la LTBP-1 est un composant microfibrillaire. Les LTBP-2, -3 et -4, sont quant à elles, visualisées à la périphérie des microfibrilles.

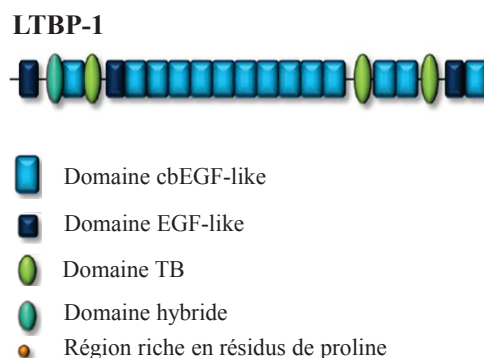
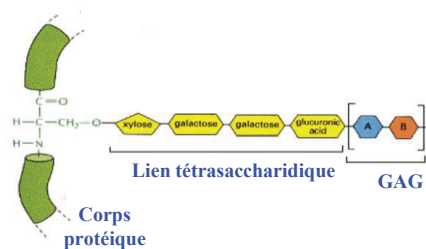
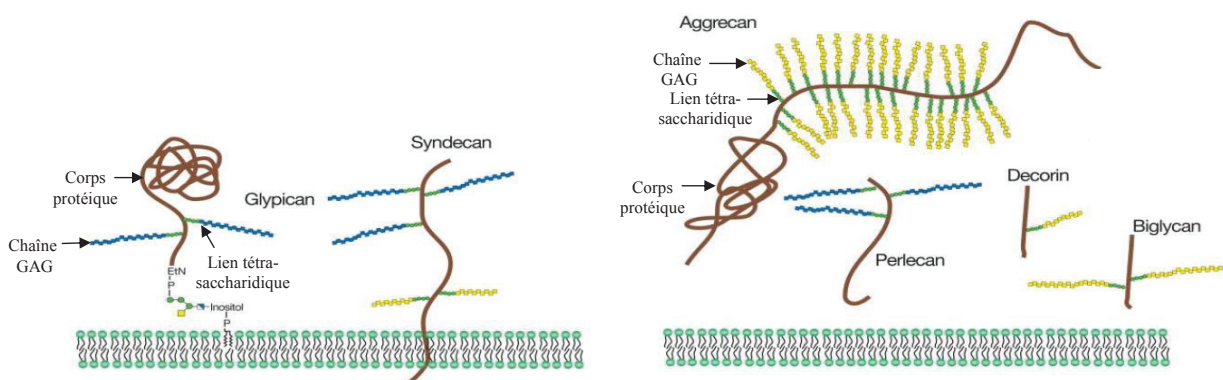


Figure 5: Représentation schématique des domaines de LTBP-1 (adaptée de Baldwin, Simpson *et al.* 2013).

Protéoglycane



Protéoglycanes de la matrice extracellulaire



38

Les fibulines sont des glycoprotéines extracellulaires, de 50 à 200 kDa, organisées en une suite de domaines cbEGF suivi d'un domaine C-terminal de type fibuline (**Figure 7**) (Argaves, Greene *et al.* 2003). La superfamille des fibulines comprend 7 fibulines classées en deux sous-groupes, en fonction de la longueur et de la structure de leurs domaines. Le premier sous-groupe se compose de longues fibulines (fibuline-1,-2 et -6) alors que le deuxième sous-groupe est constitué de courtes fibulines (-3,-4,-5,-7). Les fibuline-1,-2,-3,-4 et -5 lient la tropoélastine *in vitro* et les fibuline-2,-3,-4 et -5 sont impliquées dans le développement des fibres élastiques *in vivo* (Yanagisawa and Davis 2010). La fibuline-2 lie fortement la tropoélastine *in vitro* (Sasaki, Göhring *et al.* 1999) et intervient, *in vivo*, dans la formation de la lame élastique interne de la paroi aortique (Chapman, Sicot *et al.* 2010). La fibuline-3, quant à elle, se lie faiblement à la tropoélastine *in vitro*. Cependant, les souris déficientes (*Fbln3*^{-/-}) présentent une altération des fibres élastiques dans les tissus conjonctifs fibro-élastiques (*fascia*) de la paroi du corps. Par conséquent, la fibuline-3 joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité du tissu conjonctif fibro-élastique (Kobayashi, Kostka *et al.* 2007). Les fibuline-4 et -5 sont impliquées dans différents aspects de la formation des fibres élastiques *in vivo*, qui ne peuvent être compensés (Papke and Yanagisawa 2014). De plus, la fibuline-4 possède des fonctions supplémentaires qui affectent le développement embryonnaire. Contrairement aux souris déficientes (*Fbln5*^{-/-}), qui vivent jusqu'à l'âge adulte avec une aggravation progressive des fibres élastiques, les souris déficientes (*Fbln4*^{-/-}) présentent, quant à elles, un phénotype remarquablement plus sévère et meurent entre la fin de la gestation et la période périnatale.

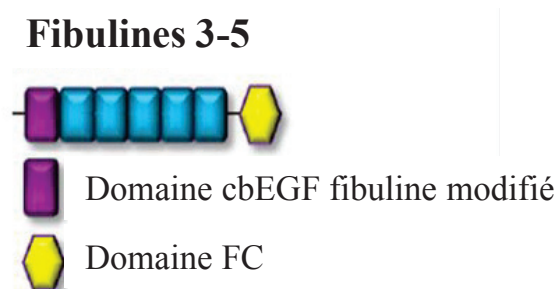


Figure 7: Représentation schématique des domaines des fibulines 3-5 (adaptée de Baldwin, Simpson *et al.* 2013).

Les ADAMTS (a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type-I motif) constituent une superfamille de protéines comprenant 19 métalloprotéases à zinc et 7 glycoprotéines ADAMTS-like (ADAMTSL), toutes sécrétées (Baldwin, Simpson *et al.* 2013). Chaque protéase ADAMTS fournit une activité catalytique par son domaine N-terminal (**Figure 8**), qui contient un domaine catalytique, un module *disintegrin-like*, un module riche en cystéine et une seule répétition thrombospondine de type I (TSR). Le domaine C-terminal diffère entre les membres de la famille, bien que plusieurs possèdent un grand nombre de domaines TSR. Les membres de la famille ADAMTSL contiennent, quant à eux, de nombreux domaines TSR mais ne sont pas en possession de domaines catalytiques et *disintegrin-like*. Plusieurs membres de la superfamille des protéines ADAMTS, incluant ADAMTS-10 et ADAMTSL 2-6 sont génétiquement et/ou fonctionnellement impliqués dans l'assemblage, la stabilité et l'ancrage des microfibrilles ou la formation de réseaux supramoléculaires ayant comme architecture les microfibrilles (Hubmacher and Apte 2015).

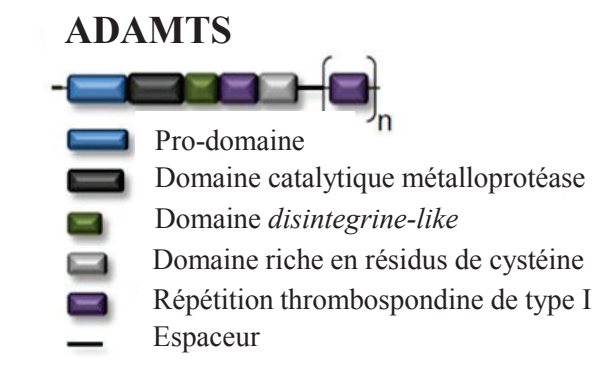


Figure 8: Représentation schématique des domaines des ADAMTS (adaptée de Baldwin, Simpson *et al.* 2013).

Les Emilines (Elastin microfibril interface located protein) sont des glycoprotéines constituées d'une longue région centrale en « coiled-coil » (Colombatti, Spessotto *et al.* 2011) (**figure 9**). Il en existe quatre isoformes : émiline-1, -2, -3 et -4. Les émiline-1 et -2 possèdent un court domaine en triple hélice ainsi qu'un domaine de trimérisation à l'extrémité C-terminale, similaire aux domaines C1q et NC1 des collagènes de type VIII et X (Kielty, Sherratt *et al.* 2002). Les émilines sont distribuées à l'interface entre l'élastine et les microfibrilles, où elles jouent un rôle important au niveau vasculaire.

A l'heure actuelle, seule l'émiline-1 a été décrite comme associée à la formation des fibres élastiques. En effet, l'émiline-1 peut réguler l'élastogénèse, maintenir la morphologie et contrôler l'homéostasie vasculaire (Zanetti, Braghetta *et al.* 2004).

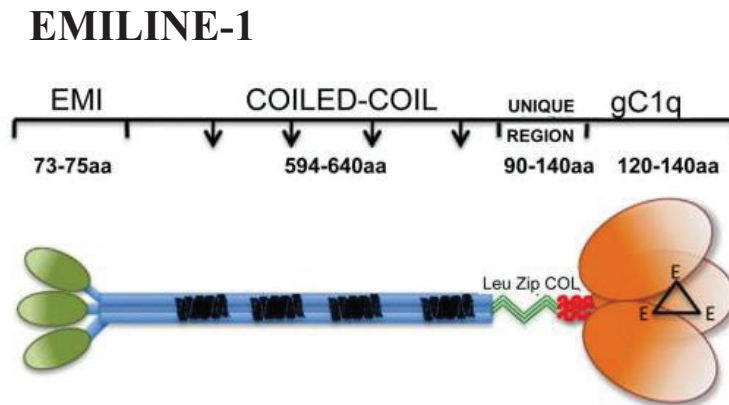


Figure 9: Représentation schématique des domaines de l'Emiline-1 (adaptée de Colombatti, Spessotto *et al.* 2011). L'émiline-1 est constituée de trois domaines EMI capables d'auto-interagir, d'une longue région centrale en forme de ressort, d'une région unique qui comprend deux domaines en leucine zippers suivis d'une séquence collagénique, et d'un domaine de trimérisation gC1q à l'extrémité C-terminale.

I.2.2. L'élastine

Le cœur des fibres élastiques est composé d'élastine, un bio-polymère insoluble et extrêmement stable, qui ne se renouvelle pas dans les tissus sains. En effet, l'élastine présente une demi-vie estimée à 74 ans, une forte hydrophobie et une très grande résistance aux dégradations chimiques, physiques et enzymatiques (Shapiro, Endicott *et al.* 1991). La stabilité de l'élastine est due à la formation de liaisons croisées, intra- et inter-chaînes, formées à partir des résidus de lysine des monomères de son précurseur soluble, la tropoélastine, suite à l'action des lysyl-oxydase (LOX) (Mithieux and Weiss 2005). Les propriétés structurales et biologiques de l'élastine ainsi que sa capacité d'organisation sont détaillées ci-après.

II. Synthèse et structure de la tropoélastine humaine

II.1. Synthèse de la tropoélastine

L'élastine est assemblée à partir d'un précurseur soluble connu sous le nom de la tropoélastine. La tropoélastine humaine (TE) est codée par un seul gène *ELN*, spécifique des vertébrés (Wise and Weiss 2009).

II.1.1. Le gène *ELN*

Le gène humain *ELN*, situé sur le locus q11.23 du chromosome 7, a été séquencé et ses éléments de régulation ont été caractérisés (Fazio, Mattei *et al.* 1991). Le gène *ELN* s'étend sur 45 kb et contient 34 exons (de l'exon 1 à 33 et un exon 36). Les exons sont petits (27 à 186 paires de bases) et se retrouvent intercalés entre de grands introns. Le rapport entre introns et exons est de 20:1, ce qui est exceptionnellement élevé (Vrhovski and Weiss 1998).

Une des particularités du gène *ELN* est que chaque exon code pour un domaine de la protéine qui porte alors son numéro d'exon, par exemple l'exon 1 code pour le domaine 1, l'exon 2 pour le domaine 2, etc... (**Figure 10**).

Les exons 34 et 35 ont été perdus au cours de l'évolution et sont retrouvés dans les génomes d'autres mammifères tels que le lapin, le chat, le porc et le bœuf, prouvant ainsi l'existence de variations inter-espèces (Wise and Weiss 2009). L'exon 26A est, quant à lui, spécifique de la tropoélastine humaine. L'exon 36 est très conservé entre les différentes espèces (>70%). Cet exon code pour la partie C-terminale de la protéine, en amont d'une longue région 3' non traduite et, dont la fonction est liée à la stabilisation de l'ARNm affectant alors la synthèse de l'élastine.

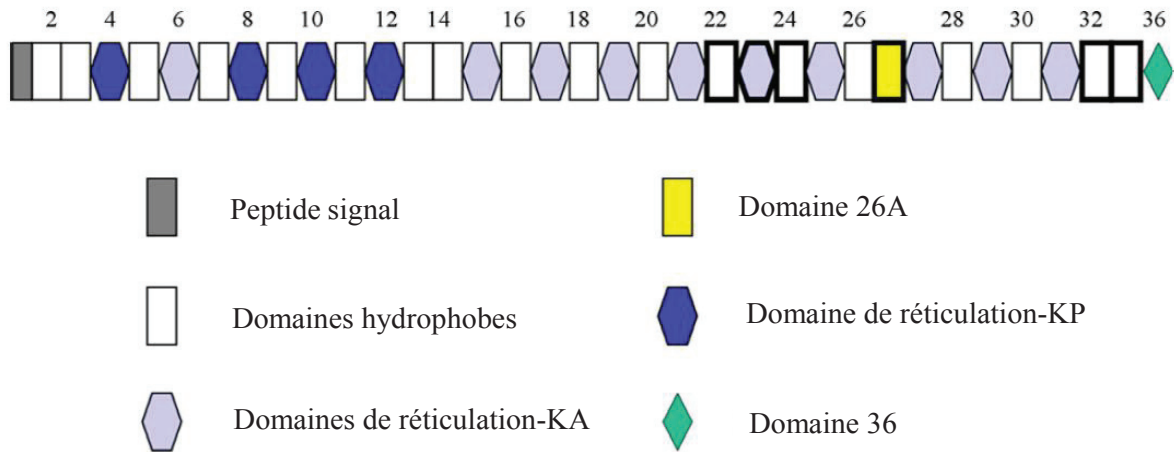


Figure 10: Carte des domaines de la tropoélastine humaine. La tropoélastine est constituée d'une alternance de domaines hydrophobes et de réticulation ainsi qu'un domaine C-terminale, le domaine 36. Les domaines en gras représentent les exons les plus couramment épissés (adaptée de Wise and Weiss 2009).

II.1.2. Régulation de la transcription du gène *ELN*

Le gène *ELN* est contrôlé par plusieurs éléments. Le promoteur du gène humain présente à la fois des sites de régulations positifs et négatifs (Rosenbloom, Bashir *et al.* 1991). La région flanquante 5' proximale du gène ne possède pas de séquence consensus boîte TATA ni de boîte CAAT fonctionnelle pour initier distinctement la transcription, de ce fait huit points d'initiation à la transcription ont pu être décrits (Bashir, Indik *et al.* 1989; Rosenbloom, Bashir *et al.* 1991). Plus amont, cette région promotrice riche en GC présente de multiples sites de liaison pour des facteurs de transcription SP1 (*Specificity Protein-1*) et AP-1 et -2 (*Activator Protein*) nécessaires à l'activité transcriptionnelle basale du gène (Hamalainen, Kemppainen *et al.* 1993). Une baisse de l'expression de la TE est observée au cours de la période post-natale, ce qui suggère des mécanismes post-transcriptionnels et transcriptionnels. En effet, des études ont permis de mettre en évidence une baisse de l'activité du promoteur de la TE et des mécanismes de déstabilisation de l'ARNm (Johnson, Robson *et al.* 1995). Des facteurs de transcription ont été décrits comme capables de se fixer à la séquence promotrice et moduler l'expression du gène *ELN*. Parmi les facteurs de régulation positive, les membres de la famille du NF-1 (*Nuclear Factor-1*) et l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) modulent l'élastogénèse en stimulant la transcription et le niveau d'ARNm de la TE (Degterev and Foster 1999) (Conn, Rich *et al.* 1996).

A l'inverse, d'autres facteurs, comme le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) et le TNF (*Tumor Necrosis Factor*), inhibent la transcription du gène *ELN* en impliquant le complexe AP-1/Fos/Jun (Carreras, Rich *et al.* 2002) (Kahari, Chen *et al.* 1992). La modulation de l'expression du gène peut aussi se concevoir par l'action de cytokines, ainsi l'interleukine-1 β (IL-1 β) diminue la transcription du gène *ELN* via l'activation de NF κ B (*Nuclear Factor-kappa B*), alors que l'interleukine-10 la stimule et potentialise les effets du TGF- β , impliqué dans la stabilisation de l'ARNm de la TE (Mauviel, Chen *et al.* 1993) (Reitamo, Remitz *et al.* 1994).

II.1.3. Epissage alternatif du gène *ELN*

Le transcrit primaire du gène *ELN* est soumis à un fort épissage alternatif, affectant 30 % des exons et conduisant à la production de nombreuses isoformes de la protéine. Les exons les plus couramment épissés sont les exons 22, 23, 24, 26A, 32 et 33 (Holzenberger, Levi-Minzi *et al.* 1993). A ce jour, 13 variants ont été décrits et référencés dans la base de données de NCBI, auxquels s'ajoutent 12 variants prédictifs pouvant être associés à des isoformes de protéines. Le domaine 23, codé par l'exon 23, est un domaine dit de réticulation tandis que les domaines 22, 24, 32 et 33, codés par les exons respectifs, correspondent à des domaines hydrophobes. Le domaine 26A, spécifique de la TE humaine, est néanmoins rarement retrouvé dans les isoformes des tissus sains et est plutôt associé à des situations pathologiques telles que l'hypertension, dans lequel il serait à l'origine des altérations observées dans les fibres élastiques (Debelle and Tamburro 1999) (Sato, Wachi *et al.* 2006).

Cet épissage alternatif explique les variations de taille et le nombre d'isoformes de la TE que l'on peut retrouver dans les tissus et les cultures cellulaires. Néanmoins, quel que soit son mode d'épissage (excision complète ou partielle d'un exon), la structure primaire de la TE est toujours constituée d'une alternance de domaines hydrophobes et de domaines de réticulation (**Figure 10**).

II.1.4. Traduction de l'ARNm en tropoélastine

Suite à un épissage alternatif, l'ARNm mature de la TE est exporté du noyau. La synthèse de la TE a lieu à la surface du réticulum endoplasmique granuleux (REG) de plusieurs types cellulaires, tels que les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les fibroblastes, en réponse à des stimuli, incluant le stress mécanique, les glucocorticoïdes et les cytokines, dont le TNF- α ou l'IL-1 β (Pasquali-Ronchetti, Baccarani-Contrì *et al.* 1993).

Le taux de synthèse de la TE dépend de l'âge et atteint son niveau maximal pendant la période périnatale (Mecham 1991). Bien que la synthèse d'élastine soit minime chez l'adulte, elle peut être occasionnellement réactivée pour réparer les fibres élastiques endommagées ou dégradées au cours du vieillissement ou dans certaines pathologies, telles que l'athérosclérose et la maladie pulmonaire obstructive chronique, néanmoins les fibres élastiques de réparation sont souvent moins fonctionnelles que celles formées lors du développement (Zhang, Wu *et al.* 2012). La TE est synthétisée sous la forme d'un polypeptide de 72 kDa (786 résidus d'acides aminés) qui va subir dans le REG un clivage du peptide signal (26 acides aminés), libérant une protéine mature de 60 kDa (Wise and Weiss 2009).

II.2. Structure de la tropoélastine

II.2.1. Structure primaire

La TE est présente sous la référence P15502 dans la base de données UniProt. La TE est constituée d'une alternance de domaines hydrophobes et de domaines de réticulation (**Figure 10**) (Vrhovski and Weiss 1998). Cet arrangement unique, dont la moindre modification est susceptible d'altérer significativement l'assemblage et la fonction de la protéine, a évolué de manière convergente en protéines élastomériques (Song and Parkinson 2012).

Les domaines de réticulation sont composés de résidus lysyl séparés par des fragments de polyalanyl de 2 à 3 résidus d'acides aminés tels que : AAKAAKAA, donnant naissance à la nature cationique de ces domaines (Dyksterhuis, Baldock *et al.* 2007). Les résidus lysyl, au sein des domaines de réticulation, sont extrêmement bien ordonnés et suffisamment proches les uns des autres pour se lier par condensation spontanée, permettant ainsi de coupler deux monomères de TE. Tandis que les domaines de réticulation sont relativement courts et conservés entre les différentes espèces, les séquences hydrophobes plus longues sont aussi plus variables.

Les domaines hydrophobes sont riches en résidus apolaires : glycyl, valyl, alanyl, leucyl, isoleucyl et prolyl. Ils sont organisés en séquences répétitives du type : GX, PX, GGX et PGX où X = A, V, L, I ou G), et constituent jusqu'à 75% de la séquence de la TE (Debelle and Tamburro 1999). Ces peptides hydrophobes, lorsqu'ils sont libérés à partir de la TE par protéolyse, sont bioactifs (Heinz, Jung *et al.* 2012) et peuvent stimuler l'expression des protéines matricielles y compris la TE (Wachi, Seyama *et al.* 1995).

Une autre particularité de la TE est son domaine C-terminal codé par l'exon 36. Plus de 70% de sa séquence est hautement conservée entre les différentes espèces, en particulier les résidus terminaux chargés RKRK. La région C-terminale, contient également les deux seules cystéines de la protéine, stabilisées par un pont disulfure intra-chaîne. La suppression du pont disulfure et de l'extrémité C-terminale réduit considérablement la capacité de la TE à s'assembler et à s'incorporer au sein des fibres élastiques (Nonaka, Sato *et al.* 2014). Ce domaine interagit directement avec d'autres protéines des fibres élastiques lors de l'élastogenèse, mais également avec d'autres composés à la surface cellulaire comme l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et des glycosaminoglycanes tels que le chondroïtine sulfate et l'héparane sulfate (Broekelmann, Kozel *et al.* 2005).

II.2.2. Structure secondaire

Les premières connaissances structurales de la TE proviennent des études par spectroscopie infrarouge et par dichroïsme circulaire (DC) de l' α -élastine, un produit dérivé de l'hydrolyse acide de la TE (Mammi, Gotte *et al.* 1968). Les résultats indiquent que la TE a essentiellement une structure désordonnée. Les études par résonnance magnétique nucléaire révèlent que la majorité des atomes de carbone, constituant le squelette carboné de la TE, sont très mobiles (Lyerla and Torchia 1975).

Les algorithmes de prédiction des structures, basés sur la séquence, ont estimé environ 75% de désordre dans la structure du monomère de la TE (Muiznieks and Weiss 2007). Des études antérieures de spectroscopies par DC et Raman, sur la TE recombinante et les peptides élastiques, ont également confirmé la présence d'une grande quantité de régions hautement désordonnées, attribuées aux domaines hydrophobes (He, Miao *et al.* 2012). L'abondance des structures désordonnées au sein de la TE se manifeste par la flexibilité intrinsèque de la molécule (Roberts, Dzuricky *et al.* 2015). Les polypeptides à base d'élastine alternent entre différentes conformations en équilibre, donnant un ensemble de conformations comprenant des structures en coudes- β , brins- β et hélice gauche de type polyproline II (PPII). Les structures de type PPII sont définies par une absence de liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires, et peuvent par conséquent s'interconvertir en d'autres conformations (Bochicchio and Pepe 2011).

En milieu aqueux, la TE présente une forme très flexible. La dynamique structurale du squelette carboné de la TE est principalement obtenue par le rapport des résidus de proline rigides sur les résidus de glycine flexibles. Les contraintes stériques imposées par la proline et l'entropie de la glycine déterminent les conformations possibles du squelette carboné. L'agencement des résidus de glycine et proline favorise la formation de coudes- β labiles, contribuant de manière significative à la flexibilité au sein de la protéine (Roberts, Dzuricky *et al.* 2015). En plus de l'hélice gauche de type PPII et des autres structures labiles, les unités répétées des motifs hydrophobes de la TE forment aussi des structures plus compactes telles que de courts feuillets- β et coudes- β (Tamburro, Bochicchio *et al.* 2005). En revanche, les domaines de réticulation sont associés à un faible pourcentage d'hélices α dans la protéine (Muiznieks, Weiss *et al.* 2010). Cette alternance de motifs très structurés, en hélices et coudes, avec des régions non-structurées, confère un comportement élastique strict à la molécule de TE.

II.2.3. Structure tertiaire

L'obtention de la structure tertiaire de la TE a été entravée par son incapacité à former des cristaux solubles. De plus, la nature insoluble de l'élastine polymérisée exclut l'utilisation des techniques de spectroscopies classiques (Tamburro, Bochicchio *et al.* 2003). Néanmoins, la capacité des séquences hydrophobes à être clivées par des protéases, indique la présence de régions hydrophobes exposées au solvant, ce qui suggère que les domaines hydrophobes de la TE ne sont pas restreints au cœur de la protéine contrairement aux protéines globulaires classiques, qui ont leurs résidus hydrophobes enfouis et leurs résidus polaires en contact avec le solvant (Muiznieks and Weiss 2007). De plus, un pourcentage élevé du monomère de la TE, incluant les régions hydrophobes, reste partiellement accessible dans la structure de l'élastine réticulée. Des études récentes utilisant la diffusion des rayons X, SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*), et des neutrons, SANS (*Small Angle Neutron Scattering*), ont permis de résoudre la structure tertiaire de la TE recombinante en solution. En plus de la protéine entière, ces mesures ont également été faites sur des fragments chevauchants de la TE, exons 2-18 et exons 2-25, permettant de définir les extrémités N- et C-terminales (**Figure 11**) (Baldock, Oberhauser *et al.* 2011).

La TE est donc une molécule asymétrique d'environ 20 nm de longueur, qui possède des régions bien distinctes :

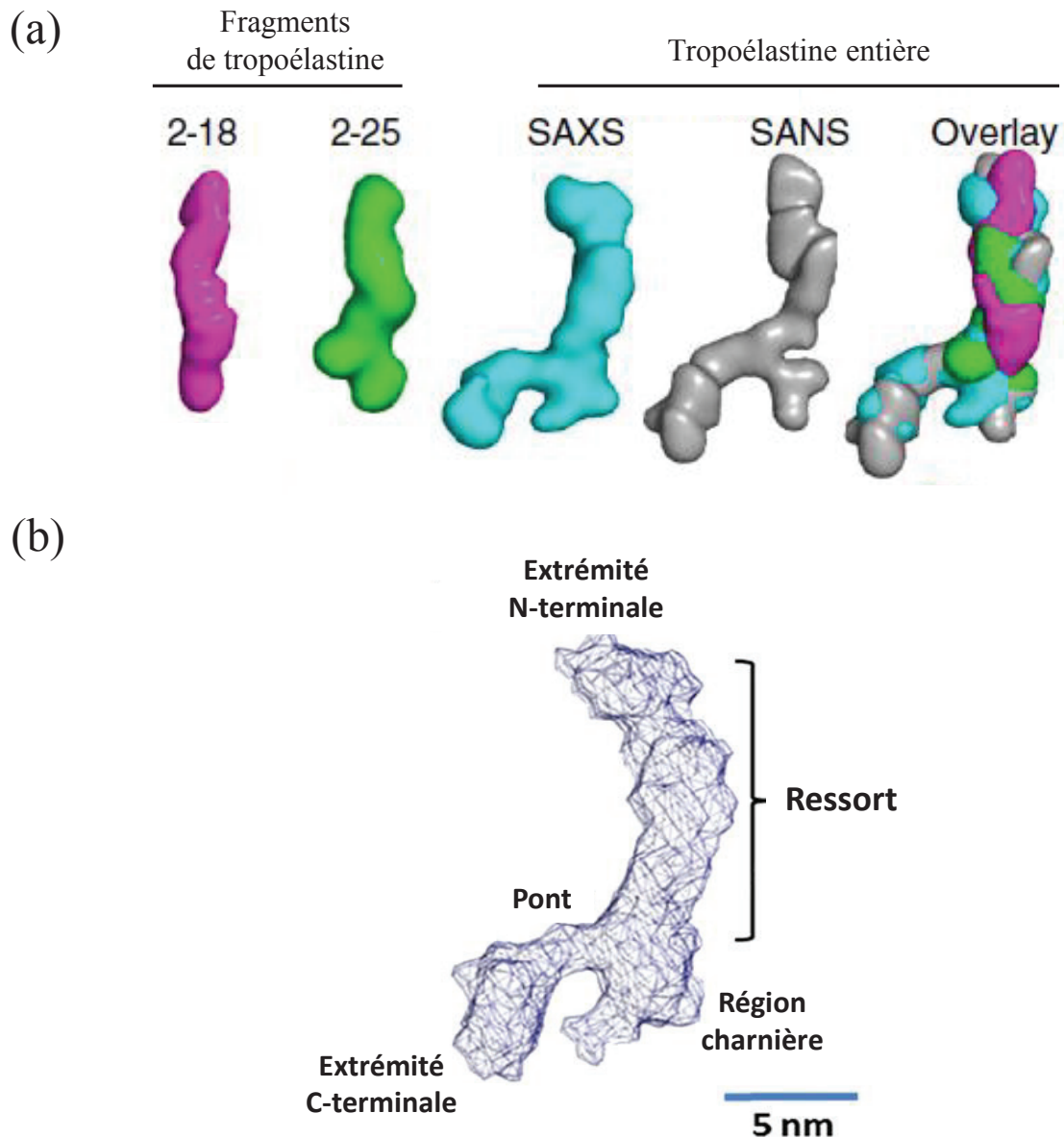


Figure 11: Structure tertiaire de la tropoélastine humaine en solution. (a) Des modèles *ab initio* ont été calculés à partir de données SAXS pour les fragments 2-18 (rose), 2-25 (vert) de la tropoélastine et sur toute la longueur de la tropoélastine (bleu), et à partir de données SANS également sur toute la longueur de la molécule (gris). Les modèles sont représentés à la fois individuellement et superposés. (b) La tropoélastine est un monomère asymétrique en solution avec des régions spécifiques qui interviennent dans l'élasticité (région en forme de ressort, « *coil* »), les interactions cellulaires (extrémité C-terminale) et la mécanique (le pont, « *bridge* ») (adaptée de Baldock, Oberhauser *et al.* 2011).

II.2.3.1. La région N-terminale

La structure de la TE en solution comprend un segment distinct, allongé et étroit (2-3 nm), qui persiste sur environ 11 nm de longueur, avant une zone de ramification (Baldock, Oberhauser *et al.* 2011). La comparaison structurale de la protéine entière avec des isoformes tronquées, à différentes distances de l'extrémité N-terminale, a permis d'attribuer ce segment linéaire à la région N-terminale de la TE, qui englobe les domaines 2 à 18. Un modèle en forme de ressort est proposé pour tenir compte de l'élasticité de la TE, qui est capable de s'étirer, de manière réversible, jusqu'à huit fois sa longueur au repos. La région N-terminale présente la même organisation structurale que la protéine entière, à savoir l'alternance de domaines hydrophobes et de réticulation (Ostuni, Bochicchio *et al.* 2007). Plusieurs études ont affirmé que seules les régions centrale et C-terminale sont impliquées dans les étapes d'assemblage des fibres élastiques (Kozel, Wachi *et al.* 2003). Néanmoins, la région N-terminale joue également un rôle important, mais moins bien caractérisé, au cours de l'élastogénèse. Elle contribue à la structure du coacervat (auto-assemblage des monomères de TE décrit ultérieurement), comme en témoigne la transition conformationnelle (brins- β en hélice- α) affichée par le peptide 2-7 lors de l'augmentation de l'hydropathie ambiante (caractère hydrophile ou hydrophobe de la chaîne latérale d'un acide aminé) (Ostuni, Bochicchio *et al.* 2007). De plus, la région N-terminale peut faciliter l'intégration de la TE dans l'architecture microfibrillaire. Bien que la fibrilline-1 se lie à la TE en de multiples sites, son point de contact principal est localisé dans la région N-terminale de la protéine (Clarke, Wise *et al.* 2005). Par ailleurs, plusieurs domaines de la région N-terminale participent à l'étape de réticulation de la TE, au cours de l'élastogénèse. Les liaisons croisées intermoléculaires existent également entre la région N-terminale d'un monomère et la région centrale ou C-terminale d'un autre monomère (Mithieux, Wise *et al.* 2005).

II.2.3.2. La région charnière

Cette région protubérante, située sur le côté de la molécule, comprend les domaines 20 à 24. Les domaines attenants, domaines 21 et 23, contiennent un peptide central GVGTP qui est prédit pour former un coude flexible ou une région charnière (Miao, Cirulis *et al.* 2005). La région charnière est non structurée et contribue à la flexibilité de la molécule (Dyksterhuis and Weiss 2010). Des études de dynamique moléculaire ont démontré que la région charnière peut adopter une conformation fermée, dans laquelle les segments hélicoïdaux sont anti-parallèles, ou une structure ouverte dans laquelle ces segments sont parallèles et étendus.

Cette région charnière oscille entre ces deux modèles avant de converger en une structure fermée en épingle à cheveux (Djajamuliadi, Kagawa *et al.* 2009). Ceci met en évidence l'implication la région charnière dans l'élasticité de la TE. La flexibilité conformationnelle de cette région semble être intimement liée à la fonction de la TE dans l'assemblage des fibres élastiques. En effet, cette flexibilité dynamise les domaines hydrophobes impliqués dans l'assemblage des molécules de TE par coacervation. La région charnière, qui englobe également des domaines de réticulation, est impliquée dans la réticulation par la formation de liaisons intra- et intermoléculaires entre les résidus de lysine par l'intermédiaire de la LOX (Kumashiro, Ho *et al.* 2006).

II.2.3.3. Le pont

Au-delà de la région charnière et jusqu'à la région C-terminale, se forme un pont composé des domaines 25 et 26. Contrairement aux autres régions, peu de données existent concernant le rôle fonctionnel de cette région. Un modèle propose l'implication du pont dans l'assemblage des fibres élastiques, étant donné la présence du domaine 26, essentiel à la coacervation (processus d'auto-assemblage des monomères de TE décrit par la suite), et sa proximité avec d'autres domaines hydrophobes impliqués dans ce processus (Jensen, Vrhovski *et al.* 2000). Structurellement, le pont constitue une région hautement flexible et peut, par conséquent, contribuer aux changements conformationnels de la TE associés à l'organisation des monomères au cours de l'assemblage des fibres élastiques (Muiznieks, Jensen *et al.* 2003; Dyksterhuis and Weiss 2010)

De récents travaux ont présenté une construction de la TE résistante aux protéases, dans laquelle le pont a été perturbé par la substitution de l'arginine 515 en alanine (R515A) (Yeo, Baldock *et al.* 2012). Le mutant R515A, met en évidence une coacervation moins efficace. De plus, les cultures de fibroblastes dermiques et de cellules humaines de l'épithélium pigmentaire rétinien, en présence du mutant R515A, présentent une diminution de la formation des fibres élastiques. En outre, l'analyse par SAXS de la protéine mutante R515A révèle une augmentation de la flexibilité conformationnelle autour du pont et de la région C-terminale, soulignant le rôle du résidu R515 dans l'intégrité structurale du pont, et dans l'assemblage des fibres élastiques.

II.2.3.4. La région C-terminale

La TE se termine par une région plus compacte en forme de « pied », qui englobe l'extrémité C-terminale qui contient le motif d'interaction cellulaire (Baldock, Oberhauser *et al.* 2011).

La structure tertiaire de la TE fournit une indication sur ses propriétés élastiques (Tamburro, Bochicchio *et al.* 2003). Dans un état relâché, la flexibilité des chaînes polypeptidiques contribue à l'augmentation de l'entropie du système. En revanche, quand la TE est étirée, les séquences hydrophobes, très probablement celles de la région en forme de ressort, sont exposées au solvant, ce qui diminue l'entropie du système et agit comme une force motrice pour le retour élastique spontanée à l'état natif désordonné (Baldock, Oberhauser *et al.* 2011) (Roberts, Dzuricky *et al.* 2015).

Outre sa souplesse et son élasticité intrinsèque, la TE possède des propriétés clés dans l'adhérence et la signalisation cellulaire. Les interactions cellulaires avec la TE sont très variées et influencent la physiologie normale de la cellule. La TE interagit avec différents types cellulaires, affectant la chimiotaxie, la morphogenèse, la prolifération et l'adhérence cellulaire, le transport d'ions, la formation des fibres d'actine et la régulation des protéines matricielles (Wise, Yeo *et al.* 2014).

Comme toutes les protéines matricielles, les interactions entre la TE et les cellules sont principalement basées sur l'adhérence, impliquant des interactions avec des récepteurs de la TE. Trois grandes classes de récepteurs sont impliquées dans la liaison TE-cellule : le récepteur lié à l'élastine « *Elastin Binding Protein* » (EBP), les glycosaminoglycanes (GAG) et les intégrines (**Figure 12**) (Almine, Bax *et al.* 2010).

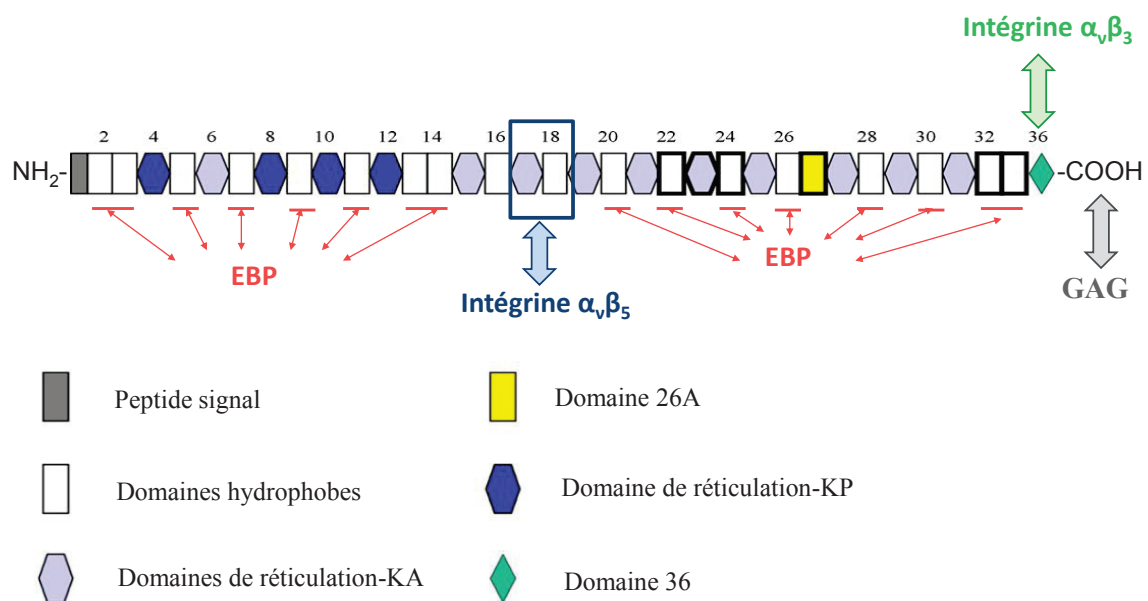


Figure 12: Les récepteurs qui interagissent avec la tropoélastine humaine favorisant l'adhérence cellulaire. L'EBP interagit avec la séquence consensus XGXXPG présente dans les domaines hydrophobes de la protéine. Les GAG interagissent avec l'extrémité C-terminale de la TE. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ interagit avec le motif GRKRRK présent au niveau du domaine 36 de la TE. Alors que l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ interagit approximativement entre les domaines 17 et 18 de la TE (adaptée de Wise and Weiss 2009).

III.1.1. L'EBP

L'EBP, protéine de 67 kDa, est un variant d'épissage membranaire périphérique de la β -galactosidase lysosomale (S-Gal), dépourvu d'activité enzymatique (Hinek and Rabinovitch 1994). L'EBP présente une forte affinité pour la séquence hydrophobe VGVAPG, localisée dans le domaine 24 de la TE, et pour les sucres galactosés de type galactose ou lactose.

L'EBP est exprimé par un grand nombre de types cellulaires. Il intervient dans l'assemblage de l'élastine en favorisant l'alignement des monomères de TE sécrétés et en les protégeant de la dégradation par les protéases. L'EBP est aussi le principal récepteur impliqué dans la capacité de l'élastine et de ses produits de dégradation à influencer le comportement cellulaire à travers la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que l'expression des gènes (Hinek and Rabinovitch 1994). Les souris knock-out pour la β -galactosidase n'expriment plus l'EBP, mais présentent un dépôt correct de la TE (Hahn, del Pilar Martin *et al.* 1997). De plus, la TE favorise toujours activement l'adhérence cellulaire, alors que la séquence VGVAPG ne peut plus se lier à l'EBP. Ces observations suggèrent que des récepteurs, autres que l'EBP, sont susceptibles d'interagir avec la TE. Toutefois, l'EBP ne peut pas délivrer de message intracellulaire en l'état et doit être associée avec deux autres protéines transmembranaires pour former un complexe récepteur à l'élastine trimérique. Ces protéines correspondent à la cathepsine A et à la neuranimidase-1. Le mécanisme d'action du récepteur repose sur l'activité sialidase de la neuranimidase-1 qui est capable d'effectuer une conversion lipidique GM(3)/lactosylcéramide. Le lactosylcéramide a ainsi été proposé comme premier messenger intracellulaire en réponse au changement conformationnel de l'EBP lorsque celle-ci est liée à un motif du type XGXXPG (Rusciani, Duca *et al.* 2010).

III.1.2. Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAG), localisés sur la surface cellulaire, interagissent avec la région C-terminale de la TE. Cette région se termine par la séquence chargée RKRK et contient les deux seuls résidus de cystéine de la molécule, qui forment un pont disulfure intramoléculaire (Wise, Yeo *et al.* 2014). Les caractéristiques structurales spécifiques de cette région ont incité des études à se focaliser sur sa signification fonctionnelle. Ce domaine a initialement été lié à l'assemblage supramoléculaire dans la mesure où la réduction du pont disulfure diminue considérablement la capacité de la TE à s'incorporer dans les fibres élastiques, et la mutation des cystéines abolit l'incorporation de la TE dans les fibres (Brown, Mecham *et al.* 1992).

Le domaine C-terminal a ensuite été associé à la liaison cellulaire par l'intermédiaire d'interactions avec de deux types de GAG : l'héparane sulfate et le chondroïtine sulfate. Il a d'abord été montré que ces GAG pouvaient se lier aux domaines 15-36 de la tropoélastine bovine, mais pas aux domaines 15-29, indiquant la nécessité de l'extrémité C-terminale. La région d'interaction a ensuite été montrée comme se limitant aux 17 derniers acides aminés ; néanmoins, les 25 derniers résidus semblent nécessaires à la liaison complète (Broeckelmann, Kozel *et al.* 2005). Bien que l'interaction GAG-tropoélastine soit bien établie pour la tropoélastine bovine, elle n'a pas été démontrée pour la tropoélastine humaine. Ceci est vraisemblablement dû au fait que cette interaction se produit avec les domaines codés par les exons 34 et 35 de la tropoélastine bovine, exons absents dans la tropoélastine humaine (Bax, Rodgers *et al.* 2009).

III.1.3. Les intégrines

L'interaction cellulaire avec l'extrémité C-terminale de la TE se produit également par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires appelés intégrines, en particulier avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$. Ces interactions sont cations dépendantes. La TE ne contient pas la séquence consensus Arg-Gly-Asp (RGD), portée par de nombreuses protéines matricielles, et permettant la liaison aux intégrines $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1/\beta_3/\beta_5/\beta_6/\beta_8$ et $\alpha_8\beta_1$. A la place de la séquence RGD, un site de liaison pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été identifié au niveau de l'extrémité C-terminale de la TE (Bax, Rodgers *et al.* 2009). Ce site est réduit au motif GRKRR, situé dans la région codée par l'exon 36 de la TE, et favorise l'adhérence des fibroblastes dermiques humains. Par ailleurs, Lee *et al.* ont récemment mis en évidence une nouvelle région d'adhérence cellulaire, située approximativement entre les domaines 17-18 de la TE, permettant l'attachement de l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ (Lee, Bax *et al.* 2014). Ces récepteurs transmembranaires permettent les interactions entre la TE et les cellules, ce qui active un grand nombre de cascades de signalisation intracellulaires et modifie le comportement de la cellule.

III.2. Les réponses cellulaires

Les réponses phénotypiques et moléculaires des cellules interagissant avec la TE sont diverses et spécifiques du type de cellule étudié.

III.2.1. La chimiotaxie

Les monocytes ont été le premier type cellulaire à présenter une réponse chimiotactique en réponse aux peptides dérivés de la TE. Par la suite, il a été démontré que les fibroblastes et les neutrophiles du ligament nuchal de bovin fœtal sont capables de migrer vers les hexapeptides contenant le motif consensus XGXXPG, en particulier le peptide VGVAPG qui a induit la réponse maximale (Kamoun, Landeau *et al.* 1995). Cette séquence est présente dans les domaines hydrophobes de la TE, notamment dans le domaine 24, et se lie fortement à l'EBP. La chimiotaxie est le phénomène par lequel les cellules se dirigent activement vers les zones lésées. Dans la cicatrisation, les peptides élastiques et les débris cellulaires initient le début de la réparation des tissus en induisant l'afflux de cellules inflammatoires telles que les monocytes et les fibroblastes, et le remodelage. La capacité chimiotaxique de l'élastine a été identifiée avec les peptides élastiques, signifiant que les réticulations trouvées dans élastine mature ne sont pas indispensables pour induire cette réponse cellulaire (Almine, Bax *et al.* 2010).

III.2.2. L'adhérence et la prolifération cellulaire

En plus de la chimiotaxie et de la migration, la TE influence aussi l'adhérence et la prolifération cellulaire. La TE favorise la croissance cellulaire en agissant en synergie avec des peptides élastiques. L'élastine, la TE et les peptides élastiques ont tous la capacité de promouvoir l'adhérence et la croissance des fibroblastes *in vitro* (Bax, Rodgers *et al.* 2009) (Kamoun, Landeau *et al.* 1995). Cet effet est maintenu dans les constructions 3D denses à base d'élastine à la surface desquelles la croissance d'une monocouche de cellules peut être observée (Rnjak, Li *et al.* 2009).

L'adhérence des fibroblastes sur la TE varie également en fonction des caractéristiques physico-chimiques de la surface. La TE immobilisée sur une surface de polystyrène, relativement hydrophobe, entraîne une augmentation de l'étalement des fibroblastes dermiques humains de l'ordre de 80% comparée à une surface non fonctionnalisée (Bax, McKenzie *et al.* 2009).

En revanche, sur une surface de polytetrafluorethylene (PTFE), polymère plus hydrophile que le polystyrène, l'extrémité C-terminale est enfouie dans la structure de la TE, réduisant l'adhérence des fibroblastes (**Figure 13**) (Bax, Wang *et al.* 2011). Par conséquent, ce procédé visant à coupler la TE à un matériau biosynthétique permet de contrôler l'orientation de la protéine et plus particulièrement d'assurer la présentation de son extrémité C-terminale aux cellules dans le but d'optimiser leur adhérence et la réponse biologique sous-jacente (Le Brun, Chow *et al.* 2012).

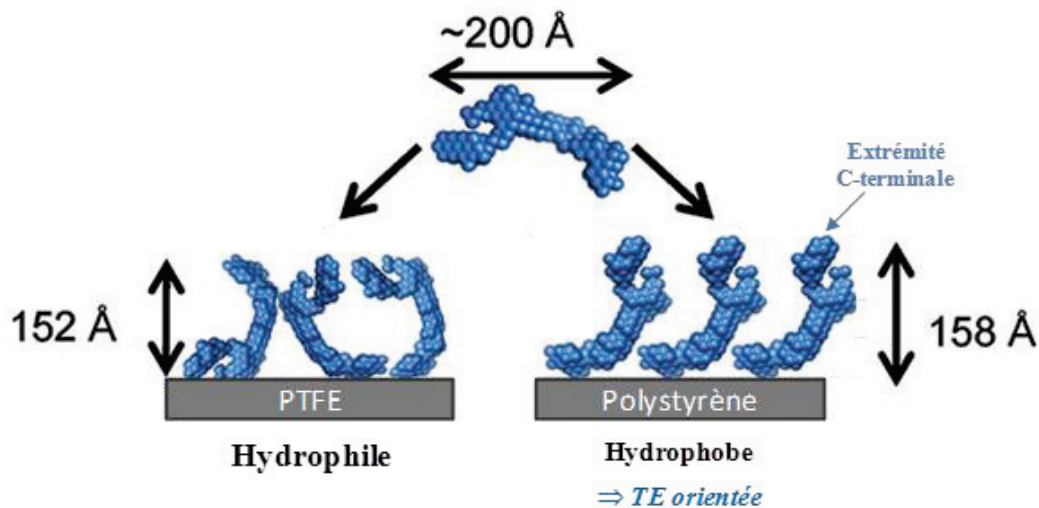


Figure 13: Orientation moléculaire de la tropoélastine en fonction de l'hydrophobicité de la surface. Sur une surface hydrophobe (polystyrène), les monomères de TE s'orientent et exposent leur extrémité C-terminale au solvant, ce qui peut favoriser l'adhérence des cellules si elles sont cultivées sur ce type de surface. En revanche sur une surface hydrophile (PTFE), l'extrémité C-terminale des monomères de TE est enfouie au sein de la structure, entraînant une diminution de l'adhérence des cellules si elles sont cultivées sur ce type de surface, (adaptée de Le Brun, Chow *et al.* 2012).

La prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* est améliorée en présence de TE, notamment dans le cas où les cellules doivent être renouvelées. Ceci inclut la prolifération des fibroblastes dermiques pour la réparation de la peau lésée (Kamoun, Landeau *et al.* 1995), et la stimulation d'un phénotype angiogénique qui implique la migration et la prolifération des cellules endothéliales nécessaires au remodelage du réseau vasculaire (Robinet, Fahem *et al.* 2005). L'adhérence et la prolifération des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC pour *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) sont augmentées sur des surfaces fonctionnalisées avec la TE, bien que le site de liaison et le mécanisme ne soient pas encore élucidés (Wise, Byrom *et al.* 2011).

L'adhérence des cellules endothéliales de l'artère coronaire humaine (HCAEC pour *Human Coronary Artery Endothelial Cells*), sur des surfaces fonctionnalisées avec la TE, se fait en partie par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Néanmoins, le site de cette interaction et l'implication d'autres partenaires n'ont pas encore été élucidés (Wilson, Gibson *et al.* 2011).

III.2.3. La différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire peut être une réponse phénotypique des cellules suite à une modification du microenvironnement cellulaire, ou bien une étape finale dans la maturation des cellules. Dans la cicatrisation des plaies cutanées, les fibroblastes dermiques peuvent se différencier en myofibroblastes et sont responsables de la fermeture de la plaie par contraction (Sarrazy, Billet *et al.* 2011). La TE peut influencer cette différenciation en modifiant le phénotype et la fonction cellulaire. Par exemple, la TE peut supprimer la différenciation des fibroblastes prolifératifs en myofibroblastes contractiles (de Vries, Middelkoop *et al.* 1994). La région de la TE et le mécanisme moléculaire qui induit ce phénomène n'ont pas encore été élucidés.

A l'inverse, la différenciation terminale des kératinocytes de l'épiderme est nécessaire pour former un épiderme stratifié. La TE, par l'intermédiaire du motif VGVAPG, est capable d'induire la migration et la différenciation terminale des kératinocytes humains, deux étapes nécessaires à la reconstruction d'un épiderme et à la fonction de barrière cutanée (Almine, Bax *et al.* 2010).

La TE joue également un rôle dans le système vasculaire en induisant et en maintenant l'organisation myofibrillaire dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (Karnik, Wythe *et al.* 2003). Ceci facilite la progression des CMLV à un phénotype contractile et de repos.

III.2.4. La régulation des protéines matricielles

L'élastine modifie l'activité cellulaire et induit l'expression d'enzymes de modifications post-traductionnelles des protéines matricielles.

En modifiant la structure de l'élastine, ces enzymes créent une boucle de rétroaction entre les cellules et l'élastine.

Les élastases sont des enzymes qui ciblent plus spécifiquement et dégradent l'élastine. La sécrétion d'élastases est une étape indispensable pour dégrader la matrice élastique et permettre ainsi la migration et la prolifération des cellules.

Les enzymes capables d'activité élastolytique comprennent les métalloprotéinases matricielles (MMP) -2, -9 et -12 ainsi que des protéases à sérine comme les élastases leucocytaires et pancréatiques. Les élastases sont impliquées dans la progression tumorale. En effet, les peptides élastiques générés par l'action des élastases favorisent non seulement la migration et la prolifération des cellules tumorales, mais induisent également une boucle d'autoamplification augmentant la sécrétion d'élastases (Coquerel, Poyer *et al.* 2009).

Comme l'élastine possède une demi-vie longue, les produits de dégradation de l'élastine indiquent typiquement un microenvironnement endommagé, en accord avec les réponses cellulaires qu'ils induisent. De plus, la dégradation de l'élastine par les élastases peut libérer des sites d'interactions cellulaires enfouis au sein de la structure de la fibre élastique, sites matricryptiques, amplifiant ainsi l'effet biologique de l'élastine sur les cellules (Almine, Bax *et al.* 2010; Almine, Bax *et al.* 2010).

La MMP-12, métalloprotéinase fortement exprimée par les macrophages, est reconnue pour cliver *in vitro* au moins 86 sites dans la TE. Les sites sensibles à la dégradation par la MMP-12, contiennent la séquence consensus GXXPG, suggérant un rôle majeur de cette enzyme dans la production de peptides bioactifs (Taddese, Weiss *et al.* 2009). Les fibroblastes cultivés sur des surfaces fonctionnalisées avec la TE présentent une augmentation spectaculaire de la sécrétion de la MMP-12. Cette réponse se fait par l'intermédiaire de l'EBP et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Almine, Wise *et al.* 2013).

Par ailleurs, le peptide de liaison à l'EBP, VGVAPG, est chimioattractant pour les cellules du mélanome et augmente la production d'élastase dans ces cellules (Pocza, Suli-Vargha *et al.* 2008). Ce mécanisme favorise l'invasion des cellules du mélanome, où ce procédé est amplifié par la quantité croissante de peptides élastiques générés. De plus, il a été démontré que la TE réticulée ainsi que l'élastine mature ont une influence sur l'activité cellulaire par contact direct avec la cellule et par leur capacité à moduler le microenvironnement cellulaire. Ces caractéristiques permettent d'envisager la conception et le développement de biomatériaux à base d'élastine biologiquement active.

IV. Capacité d'organisation de la tropoélastine humaine : assemblage des fibres élastiques

Le procédé par lequel les monomères de TE s'assemblent en fibres élastiques est appelé élastogénèse. Il se caractérise classiquement par des étapes bien distinctes de sécrétion, coacervation, dépôt sur les microfibrilles et réticulation des molécules de TE (**Figure 14**). La TE est tout d'abord sécrétée par les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les chondroblastes ou les cellules mésothéliales (Uitto, Christiano *et al.* 1991), puis coacerve, donnant de larges agrégats qui restent attachés à la surface cellulaire jusqu'au dépôt sur les microfibrilles. Les protéines microfibrillaires recrutent la LOX, qui modifie les résidus de lysine de la TE, et déclenche la formation de liaisons croisées intra- et intermoléculaires nécessaires à la formation des fibres élastiques stables et insolubles.

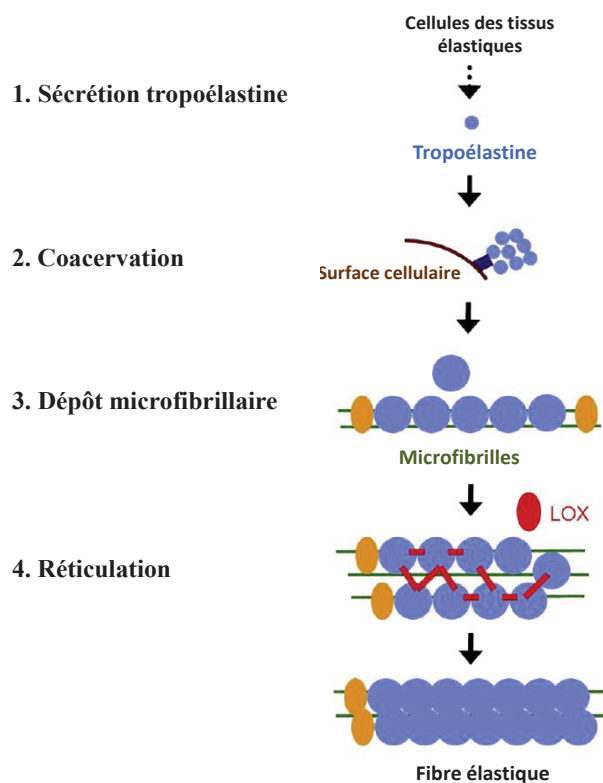


Figure 14: Modèle classique de l'assemblage des fibres élastiques. La tropoélastine est sécrétée à partir de plusieurs types cellulaires, puis coacerve, donnant de larges agrégats qui restent attachés à la surface cellulaire jusqu'au dépôt sur les microfibrilles. Les protéines microfibrillaires recrutent la lysyl oxydase, qui modifie les résidus de lysine de la tropoélastine, et déclenche la formation de liaisons croisées intra- et intermoléculaires nécessaires à la formation des fibres élastiques matures (adaptée de Yeo, Keeley *et al.* 2011).

IV.1. Sécrétion de la tropoélastine

La TE mature de 60 kDa, synthétisée à la surface du REG, se déplace à travers la lumière du REG et est transportée vers l'appareil de Golgi. La TE n'est pas glycosylée et subit peu de modifications post-traductionnelles. Néanmoins, l'hydroxylation de certains résidus de proline a été rapportée, bien que cela ne semble pas être fonctionnellement important pour l'élastogénèse. De plus, si ce phénomène se produit en excès, il semble même être préjudiciable pour la maturation de la fibre (Mecham 1991).

Pour limiter son auto-agrégation intracellulaire et sa dégradation prématurée par les protéases, la TE s'associe à l'EBP (Hinek and Rabinovitch 1994). L'EBP escorte la TE, durant tout le processus de sécrétion, depuis le REG jusqu'à l'espace extracellulaire. Ce trajet se fait par l'intermédiaire de vésicules de sécrétion. Après la sécrétion du complexe TE-EBP à la surface membranaire, l'EBP s'associe aux sous-unités neuraminidase-1 (Neu-1) et cathepsine-A formant ainsi le complexe récepteur de l'élastine fonctionnel. L'activité sialidase de Neu-1 induit la désialylation des glycoprotéines constitutives des fibres élastiques en cours de synthèse, provoquant l'accès aux résidus galactosyls. Ainsi, ces galactosides se lient au site galactolectine de l'EBP entraînant la libération du monomère de TE suite au changement conformationnel de l'EBP (Hinek, Pshezhetsky *et al.* 2006). Après relargage de la TE, l'EBP est recyclée dans une vésicule endosomale intracellulaire et peut de nouveau accompagner une molécule de TE néosynthétisée. La synthèse et la sécrétion de la TE ne semble nécessiter qu'une vingtaine de minutes (Rosenbloom and Cywinski 1976).

IV.2. La coacervation

La formation des liaisons croisées au cours de la maturation de l'élastine est reproductible et implique des résidus de lysine (Mithieux, Wise *et al.* 2005). En raison de la variabilité des séquences codantes pour les domaines de réticulation, la reconnaissance du substrat par la LOX est considérée comme étant au moins partiellement dépendante de la conformation locale (Wise, Mithieux *et al.* 2005). Ceci implique la nécessité des monomères de TE d'être préalablement alignés, afin d'assurer l'orientation correcte des chaînes latérales des lysines dans les domaines de réticulation. Par conséquent, la coacervation a été proposée pour être le processus permettant l'agrégation et l'organisation spécifique des monomères de TE.

Des études de dichroïsme circulaire ont révélé des transitions de conformation de la TE au cours de la coacervation, aboutissant à une protéine plus structurée en fin de processus (Urry, Starcher *et al.* 1969). La TE coacervée est caractérisée par des hélices α et des zones réticulées, exposées à la surface. Le rôle primordial de la coacervation dans la formation des fibres élastiques a été mis en évidence par une étude cellulaire dans laquelle l'inhibition de la coacervation, en incubant les cellules musculaires en dessous de leur température physiologique, a conduit à une diminution de la formation de l'élastine (Narayanan, Page *et al.* 1978). Par conséquent, la coacervation de la TE représente la première grande étape de l'assemblage des fibres élastiques.

IV.2.1. Etapes d'auto-assemblage *in vitro* de la tropoélastine

La coacervation a été modélisée *in vitro* par de nombreuses études, d'abord avec des mélanges d'élastine solubilisée (κ -élastine ou α -élastine), puis avec des peptides élastiques synthétiques constitués de motifs répétés hydrophobes, ensuite avec des domaines hydrophobes isolés, des fragments de domaines hydrophobes alternant avec des domaines de réticulation, ou encore avec la TE native (Yeo, Keeley *et al.* 2011). Toutes ces études ont mis en évidence que la coacervation est caractérisée *in vitro* par deux étapes : une étape initiale de séparation de phase, suivie d'une étape de maturation (**Figure 15**).

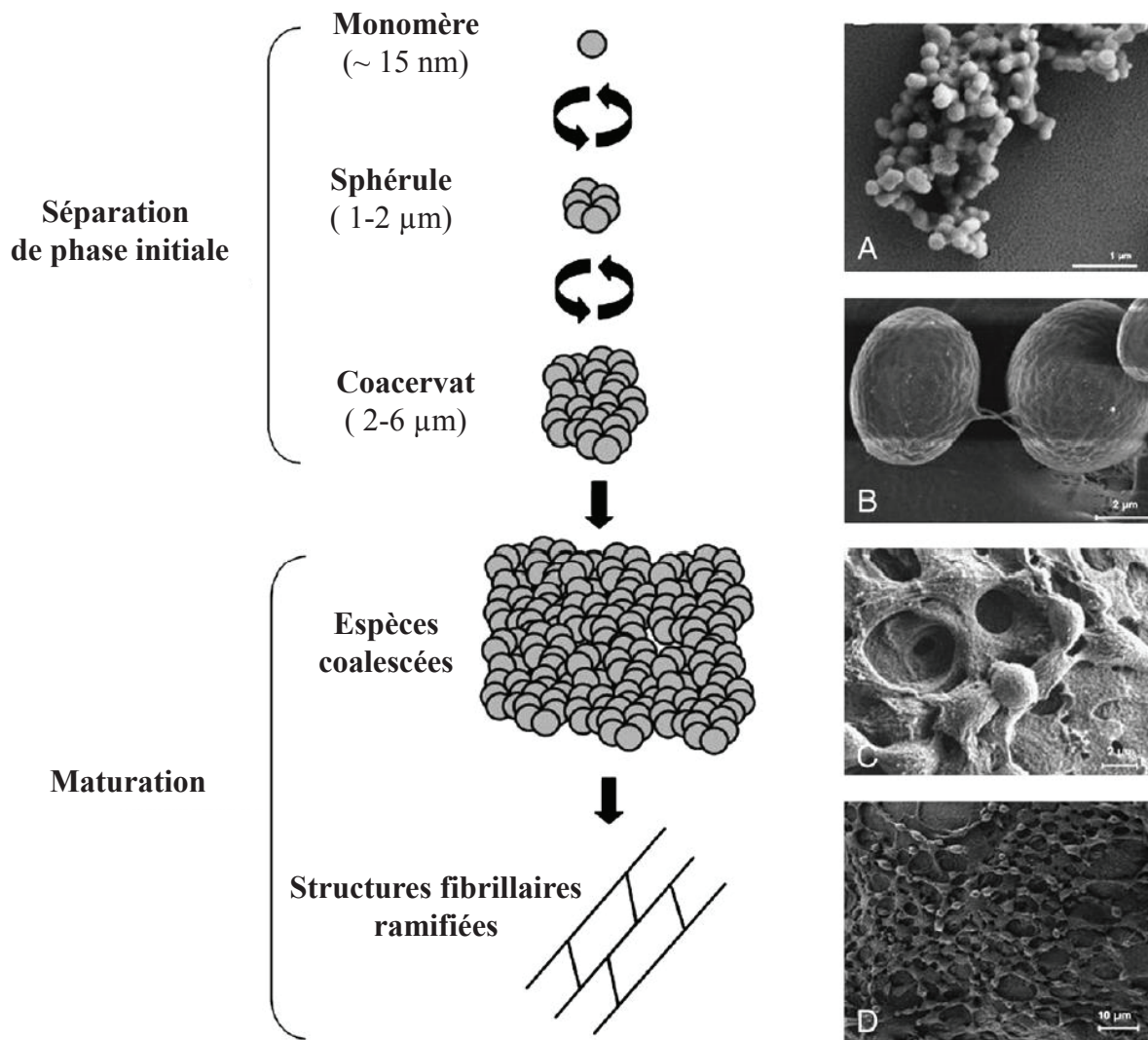


Figure 15: Etapes d'auto-assemblage *in vitro* de la tropoélastine humaine. Les monomères de tropoélastine en solution s'auto-assemblent une fois la température de transition atteinte. L'étape initiale de séparation de phase est un processus réversible dans lequel les monomères de tropoélastine (~15 nm de diamètre) s'auto-assemblent en petites sphères de 1 à 2 μm de diamètre, qui se développent progressivement en coacervats de 6 μm de diamètre. La seconde phase de maturation implique une agrégation irréversible des coacervats au sein de plus grandes espèces, pouvant former des structures fibrillaires ramifiées. Analyses par microscopie électronique à balayage de sphérules (A), de coacervats (B) et d'espèces coalescées (C-D) de tropoélastine en solution (adaptée de Yeo, Keeley *et al.* 2011).

L'étape initiale de séparation de phase est un processus réversible dans lequel, au-dessus de la température de transition, les monomères de TE (~15 nm de diamètre) passent d'une phase liquide soluble à une phase viscoélastique et s'auto-assemblent en petites sphères de 1 à 2 μm de diamètre, qui se développent progressivement en coacervats de 6 μm de diamètre (Clarke, Arnspang *et al.* 2006). La coacervation est un processus thermodynamique favorable, qui se produit en raison de la perturbation énergétique des liaisons hydrogènes dans les clathrates d'eau, formées autour de la surface des domaines hydrophobes à température physiologique. Ceci conduit à la rupture des clathrates d'eau, entraînant l'exposition des domaines hydrophobes, qui interagissent spontanément entre eux, permettant l'agrégation de la protéine (Urry 1988) (Vrhovski and Weiss 1998). Cet état assemblé et plus ordonné diminue l'entropie de la protéine, mais cette diminution est néanmoins compensée par l'augmentation de l'entropie du solvant avec la rupture des clathrates d'eau. L'agrégation des molécules de TE, pour former des microcoacervats, se manifeste par une augmentation de la turbidité de la solution (Urry 2004). Cette stabilisation spontanée peut être la conséquence des répulsions entre les surfaces des gouttelettes de protéine chargées, résultant de l'alignement des résidus de lysine après l'agrégation (Cirulis and Keeley 2010). Si la solution de TE est laissée au repos, une séparation de phase liquide-liquide se produit. La phase inférieure est constituée d'une phase viscoélastique contenant la TE très concentrée et non miscible, tandis que la phase supérieure est une solution aqueuse de TE à sa concentration critique (Urry 1988). Cette séparation de phase est un processus réversible. En effet, lors du refroidissement, les gouttelettes de TE se dissipent dans la solution. Toutefois, si le mélange est maintenu au-dessus de la température de transition pendant une période prolongée, l'étape de maturation se produit de façon irréversible où les agrégats ne se solubilisent plus malgré un refroidissement (Clarke, Arnspang *et al.* 2006).

La seconde phase de maturation implique une agrégation irréversible des coacervats au sein de plus grandes espèces, pouvant former des structures fibrillaires ramifiées. Les analyses par microscopie électronique de solutions de TE, laissées quelques minutes au-dessus de la température physiologique, révèlent la présence de filaments isolés de longueurs variables. Lorsque le temps d'incubation augmente, les filaments s'associent progressivement en faisceaux. Enfin, après plus de 10h d'incubation, un précipité blanc se forme, composé de fibrilles épaisses, ramifiées et amorphes, identiques à l'élastine (Bressan, Pasquali-Ronchetti *et al.* 1986). Etant donné la faible capacité de diffusion de la lumière de ces espèces coalescées, la phase de maturation se traduit par une diminution de la turbidité de la solution.

IV.2.2. Facteurs affectant la coacervation *in vitro*

IV.2.2.1. Les domaines hydrophobes

La nécessité des domaines hydrophobes dans le processus de coacervation a été mise en évidence par des études démontrant l'agrégation de peptides élastiques constitués uniquement de motifs hydrophobes, et l'abolition de cette capacité dans les peptides constitués uniquement de motifs hydrophiles (Miao, Cirulis *et al.* 2005). La coacervation est influencée par le nombre, la séquence et l'arrangement contextuel des domaines hydrophobes.

La coacervation est favorisée dans des espèces possédant un plus grand nombre de domaines hydrophobes. Par exemple, la suppression de deux domaines hydrophobes au sein d'un fragment de la TE inhibe la coacervation de façon plus importante que la suppression d'un seul domaine (Toonkool, Jensen *et al.* 2001). De même, la diminution du nombre de domaines hydrophobes entraîne une augmentation de la température de transition des espèces considérées. De plus, l'hydrophobicité moyenne d'un résidu affecte également le taux de coacervation, soulignant la nature coopérative de la coacervation. En effet, des fragments de TE ont montré une transition plus progressive comparée à la protéine entière, suggérant moins de coopérativité en raison d'une diminution du nombre de domaines hydrophobes (Jensen, Vrhovski *et al.* 2000).

Dans certains cas, ni le nombre de domaines hydrophobes ni l'hydropathie générale n'expliquent pleinement les différences entre les coacervats. Certains mutants de la TE, avec une hydrophobicité comparable à l'espèce sauvage, présentent une diminution d'agrégation, indiquant que la séquence d'acides aminés des domaines hydrophobes affecte aussi l'auto-assemblage (Toonkool, Jensen *et al.* 2001). Une légère modification des motifs poly(VPGG) et poly(VPGVG) en APGVGV au sein de la structure primaire d'un peptide élastique induit une précipitation irréversible (Urry 1982). De plus, le mélange aléatoire (« *scrambling* ») des séquences de ces motifs hydrophobes abolit la capacité de coacervation du peptide élastique, et conduit à une agrégation polymorphe. Par conséquent, la coacervation implique des interactions hydrophobes dépendantes de la séquence en acides aminés. Parallèlement, l'inhibition de la coacervation, due à des modifications dans les séquences hydrophobes, peut en partie provenir d'une capacité réduite à former des structures β (Rauscher, Baud *et al.* 2006).

Des perturbations dans la formation des structures β impliquent souvent des modifications dans la séquence dipeptidique PG. La proline restreint la flexibilité du squelette carboné et réduit la formation des coudes et feuillets β . En revanche, la glycine impose l'hydratation du squelette carboné, en augmentant la formation de liaisons hydrogènes avec le solvant. Par conséquent, les résidus de proline et de glycine ont un effet combinatoire dans le maintien de la flexibilité conformationnelle des chaînes de la protéine.

L'arrangement contextuel des domaines hydrophobes au sein de la TE détermine aussi la capacité de coacervation. La suppression du domaine 26 élève la température de coacervation d'une construction de la TE. Ce phénomène n'est pas inversé lorsque le domaine 26 est de nouveau ajouté à l'extrémité C-terminale de la construction (Toonkool, Jensen *et al.* 2001). Ces observations soulignent l'importance de l'arrangement contextuel des domaines hydrophobes au sein de la TE comme une condition préalable à l'auto-assemblage.

IV.2.2.2. Les domaines de réticulation

Bien que les domaines hydrophobes soient essentiels pour la séparation de phase dans le processus de coacervation, la plupart d'entre eux ne sont pas capables de promouvoir la stabilité du coacervat. Inversement, les domaines de réticulation ont généralement été considérés pour être relativement stables et passifs dans le processus d'assemblage. Néanmoins, de récentes études ont démontré l'importance des domaines de réticulation, à la fois dans la régulation et l'induction de l'auto-assemblage des peptides élastiques, et l'importance des chaînes latérales des lysines pour prévenir, dans ces domaines, la formation d'agrégats protéiques dits amyloïdes (Reichheld, Muiznieks *et al.* 2014). Les séquences des domaines de réticulation peuvent également influencer la coacervation. A titre d'exemple, un peptide élastique constitué des domaines 20-21/23-24-21/23-24, dans lesquels la séquence charnière GVGTP au sein des domaines de réticulation 21/23 a été remplacée par une séquence AAAAA, présente une diminution de sa température de transition (Kumashiro, Ho *et al.* 2006). Cette substitution entraîne une augmentation du nombre d'hélices α , conduisant à une perte de la flexibilité du peptide élastique, qui facilite l'agrégation entre les domaines hydrophobes proximaux. Ceci démontre comment des modifications dans les séquences des domaines réticulation peuvent affecter indirectement la structure des domaines hydrophobes et, par conséquent, la capacité du polypeptide à former un coacervat.

IV.2.2.3. L'environnement

Dans un environnement *in vitro*, la coacervation dépend fortement des conditions de la solution, incluant les concentrations protéique et saline, le pH, la présence de solvants organiques et la température (Urry 1982).

L'augmentation de la concentration en TE entraîne une diminution de la température de transition et une augmentation du taux de coacervation. Inversement, une diminution de la concentration en TE réduit sa capacité à coacerver. La coacervation de la TE dans une solution saline physiologique ne se produit pas en-dessous d'une concentration critique, estimée entre 1 et 3 mg/ml (Toonkool, Jensen *et al.* 2001).

Une relation linéaire existe entre la concentration en sel et la température de coacervation, comme l'ont démontrée les analyses de calorimétrie différentielle à balayage sur des peptides élastiques synthétiques (Luan, Parker *et al.* 1991). Une augmentation de la force ionique favorise l'auto-agrégation et, par conséquent, diminue la température de coacervation. Le sel augmenterait la concentration effective de la protéine en séquestrant les molécules de solvant par la formation de coquilles d'hydratation, entraînant une diminution des interactions solvant-peptide, et une déstabilisation des clathrates d'eau situés autour des domaines hydrophobes (Vrhovski and Weiss 1998). Le sel peut également supprimer les interactions électrostatiques entre les acides aminés polaires, entraînant une perturbation des interactions hydrophobes dans le processus de coacervation. Une concentration en sel de 150 mM permet la coacervation de la TE native à une température physiologique. Inversement, une diminution de la concentration en sel en-dessous de 100 mM abolit la coacervation.

La capacité de coacervation de la TE est également dépendante du pH. De nombreuses études ont démontré qu'une augmentation du pH peut abaisser la température de transition. La coacervation est maximale au point isoélectrique de la TE. En effet, le pH influence l'ionisation des groupements polaires et apolaires au sein de la protéine (Bellingham, Lillie *et al.* 2003).

Enfin, la coacervation, qui est par définition une transition de température inverse, est par conséquent influencée par la température. Les molécules de TE ne présentent pas de propriétés d'auto-agrégation en dessous d'un certain seuil de température.

La température de transition est couramment utilisée comme une mesure de la capacité des différentes séquences élastiques à coacerver (Cirulis and Keeley 2010). La coacervation de la TE est optimale à 37°C, pH 7-8 et dans des conditions salines physiologiques (150 mM NaCl) (Vrhovski and Weiss 1998).

IV.2.3. Mise au point du modèle de coacervation *in vivo*

IV.2.3.1. Implications des domaines spécifiques de la tropoélastine

Pour déterminer les domaines impliqués dans l'assemblage de la TE, des études utilisant à la fois la LOX et un agent réticulant chimique ont permis de définir les points de contact au sein des coacervats (Wise, Mithieux *et al.* 2005). La reproductibilité et la spécificité des séquences dans la formation des liaisons croisées indiquent que les interactions d'alignement ne se font pas de façon aléatoire au cours de la coacervation.

La majorité des liaisons croisées se produisent au sein des domaines 19-25, signifiant que cette région contient les principaux sites pour l'auto-agrégation. Le domaine 19 semble être le point de départ de l'alignement car des liaisons croisées, impliquant ce domaine, sont présentes aux plus faibles concentrations en agent réticulant chimique (Dyksterhuis, Baldock *et al.* 2007). Le domaine 20 peut être un contributeur majeur de la coacervation car il présente des caractéristiques supramoléculaires similaires à la TE entière (Pepe, Guerra *et al.* 2005). Le domaine 26 joue également un rôle central dans la coacervation car sa suppression ou une mutation abolit la capacité d'auto-assemblage de la TE (Jensen, Vrhovski *et al.* 2000). De plus, ce domaine représente la plus longue unité de répétition, bien conservée dans la TE, exposée à la surface et à proximité du domaine 25, qui forme des liaisons croisées avec le domaine 19 dans un arrangement antiparallèle (Brown-Augsburger, Tisdale *et al.* 1995). La disposition du domaine 26 favorise son interaction avec le domaine 18 et implique également des interactions hydrophobes entre les domaines 20 et 24 (Jensen, Vrhovski *et al.* 2000). Les domaines 16-17 sont aussi impliqués dans la coacervation. En l'absence de ces domaines, des constructions de TE présentent une altération de la coacervation, donnant de petits agrégats avec une capacité réduite à former l'élastine mature (Wachi, Sato *et al.* 2007). Les domaines hydrophobes de l'extrémité C-terminale (28, 30 et 32) sont peu susceptibles d'initier la coacervation en raison de leurs séquences plus courtes, comparées à celles des domaines centraux, et de l'absence de résidus de proline répétés favorables à la formation de coudes- β (Debelle and Tamburro 1999).

IV.2.3.2. Rôle des GAG

Les GAG, macromolécules omniprésentes à la surface des cellules, sont impliqués dans l'assemblage de l'élastine. Des études ont démontré que les GAG, tels que l'héparane sulfate et le chondroïtine sulfate, diminuent la température de transition d'isoformes de la TE et de dérivés élastiques, favorisant l'auto-assemblage de la TE (Broekelmann, Kozel *et al.* 2005) (Gheduzzi, Guerra *et al.* 2005). Les interactions TE-GAG neutralisent les charges positives sur la TE pouvant contribuer aux répulsions intermoléculaires. Il en résulte des transitions conformationnelles moléculaires qui déclenchent l'auto-agrégation (Kozel, Ciliberto *et al.* 2004). De plus, l'héparane sulfate et le chondroïtine sulfate, soutiennent la formation d'hélices α dans les domaines de réticulation qui stabilisent à leur tour les interactions entre les chaînes latérales hydrophobes (Muiznieks, Jensen *et al.* 2003).

IV.2.3.3. Rôle des protéines microfibrillaires

Dans le modèle classique de l'assemblage des fibres élastiques, le dépôt de la TE sur les microfibrilles se produit après la coacervation. Néanmoins, des études ont suggéré que la liaison entre la TE et les protéines microfibrillaires, telles que les fibrillines, les fibulines et les MAGP, peut stimuler la coacervation et l'alignement intramoléculaire (Ross, Fialkow *et al.* 1977). Un fragment de la fibrilline-1, contenant le site de liaison à la tropoélastine, induit une diminution de la température de coacervation, favorisant ainsi l'agrégation des monomères de tropoélastine (Clarke, Wise *et al.* 2005). Fait intéressant, la fibrilline-1, les fibulines -4 et -5 et MAGP-1 sont capables d'inhiber la coalescence de la TE de façon dose-dépendante. *In vivo*, ces espèces empêchent la croissance des coacervats au-delà de la taille observée, et favorisent leur regroupement en un réseau organisé (Cirulis, Bellingham *et al.* 2008). Ces résultats suggèrent que les protéines microfibrillaires peuvent avoir des effets différents sur l'étape initiale de coacervation, mais elles semblent toutes moduler la taille des gouttelettes avant l'assemblage des fibres.

IV.3. Dépôt sur les microfibrilles

La TE coacervée reste attachée à la surface des intégrines et des GAG, jusqu'au dépôt sur les faisceaux microfibrillaires (Sato, Wachi *et al.* 2006). L'association microfibrillaire est principalement dominée par le domaine 36 de la TE (Sato, Wachi *et al.* 2007). Les résidus de cystéine, présents dans le domaine 36, forment un pont disulfure qui est en contact avec les glycoprotéines acides situées dans les microfibrilles. La perturbation du pont disulfure diminue l'intégration de la TE dans les fibres élastiques. Néanmoins, des constructions de TE, où le domaine 36 est absent, se lient encore aux microfibrilles dans une certaine mesure, suggérant l'implication d'autres régions dans la molécule (Kozel, Wachi *et al.* 2003). Les candidats possibles sont les domaines 16, 17 et 30, étant donné que leur délétion entraîne aussi une diminution du dépôt de TE sur les microfibrilles (Wachi, Sato *et al.* 2007). Les protéines microfibrillaires connues pour interagir avec la TE sont les fibrillines, les fibulines et les MAGP. MAGP-1 se lie à la TE en présence de Ca^{2+} à des sites multiples couvrant l'ensemble de la molécule (Clarke and Weiss 2004). Les fibrillines interagissent avec les domaines riches en glycine et cystéine. La fibrilline-1 régule l'expansion des coacervats de TE. Le même rôle est partagé par les fibulines, en particulier les fibuline-2, -4 et -5. Le rôle des fibulines dans le dépôt de TE sur les microfibrilles est mis en évidence par l'absence de l'assemblage de la TE dans des cultures de fibroblastes sans fibulines, et par la désorganisation et la fragmentation des fibres élastiques dans les souris knock-out pour les fibulines (Cirulis, Bellingham *et al.* 2008). Le dépôt microfibrillaire de la TE est essentiel dans l'élastogénèse. En effet, les microfibrilles constituent une architecture qui dirige la forme et l'orientation des fibres élastiques. La liaison de la TE avec les protéines microfibrillaires peut également stimuler la coacervation et l'alignement des domaines de réticulation intermoléculaires, nécessaires à la maturation de l'élastine (Sato, Wachi *et al.* 2006).

IV.4. Réticulation

Une fois coacervées, les molécules de TE sont liées de façon covalente dans l'espace extracellulaire suite à l'action d'une famille d'enzymes amines oxydases dépendantes du cuivre, les lysyls oxydases. Cette famille compte aujourd'hui six isoformes : la lysyl oxydase (LOX) isoformes 1 et 2, et quatre lysyl oxidase-like-1/4.

A l'exception de la LOXL-4, toutes ces isoformes ont été montrées comme capables de réticuler l'élastine et le collagène de type I *in vitro* (Siegel, Pinnell et al. 1970). L'isoforme LOXL-2 a également été montrée comme pouvant réticuler les collagènes de types III et IV (Bignon, Pichol-Thievend *et al.* 2011). Néanmoins, les deux isoformes prépondérantes physiologiques sont LOX et LOXL-1 (Kielty, Baldock *et al.* 2002). *In vivo*, l'inactivation du gène *LOX*, l'inhibition de la LOX par le β -APN (β -aminopropionitrile) ou la suppression du cuivre entraîne dans chacun des cas une altération de la capacité des agrégats de TE à former des fibres matures (Kagan and Sullivan 1982). De plus, les fibres élastiques résultantes dévoilent une structure désorganisée. De la même manière, les souris invalidées pour *LOXL1* présentent un déficit en fibres élastiques, coïncidant avec l'accumulation de monomères de TE dans l'espace extracellulaire (Liu, Zhao *et al.* 2004).

Les LOX catalysent la désamination oxydative des groupements NH_2 - ϵ des résidus de lysine de la TE (Sato, Wachi *et al.* 2006), conduisant à la formation d'aldéhydes très réactifs tels que l'allysine, précurseur des liaisons covalentes intra- et intermoléculaires retrouvées dans l'élastine. Ces liaisons sont formées par la condensation spontanée non enzymatique de lysine à allysine ou avec d'autres résidus lysyl non modifiés. Il en résulte deux intermédiaires : la lysinonorleucine et l'allysine aldol, qui peuvent à leur tour se condenser pour former la desmosine. L'allysine aldol peut également se condenser à une autre lysine pour former la merodesmosine qui, à son tour, se condense avec une allysine pour former l'isodesmosine. Les produits finaux de ces liaisons croisées, la desmosine et l'isodesmosine, résultent donc de la condensation de quatre lysines situées à proximité les unes des autres et permettent de relier deux fibres d'élastine entre elles (**Figure 16**) (Vrhovski and Weiss 1998).

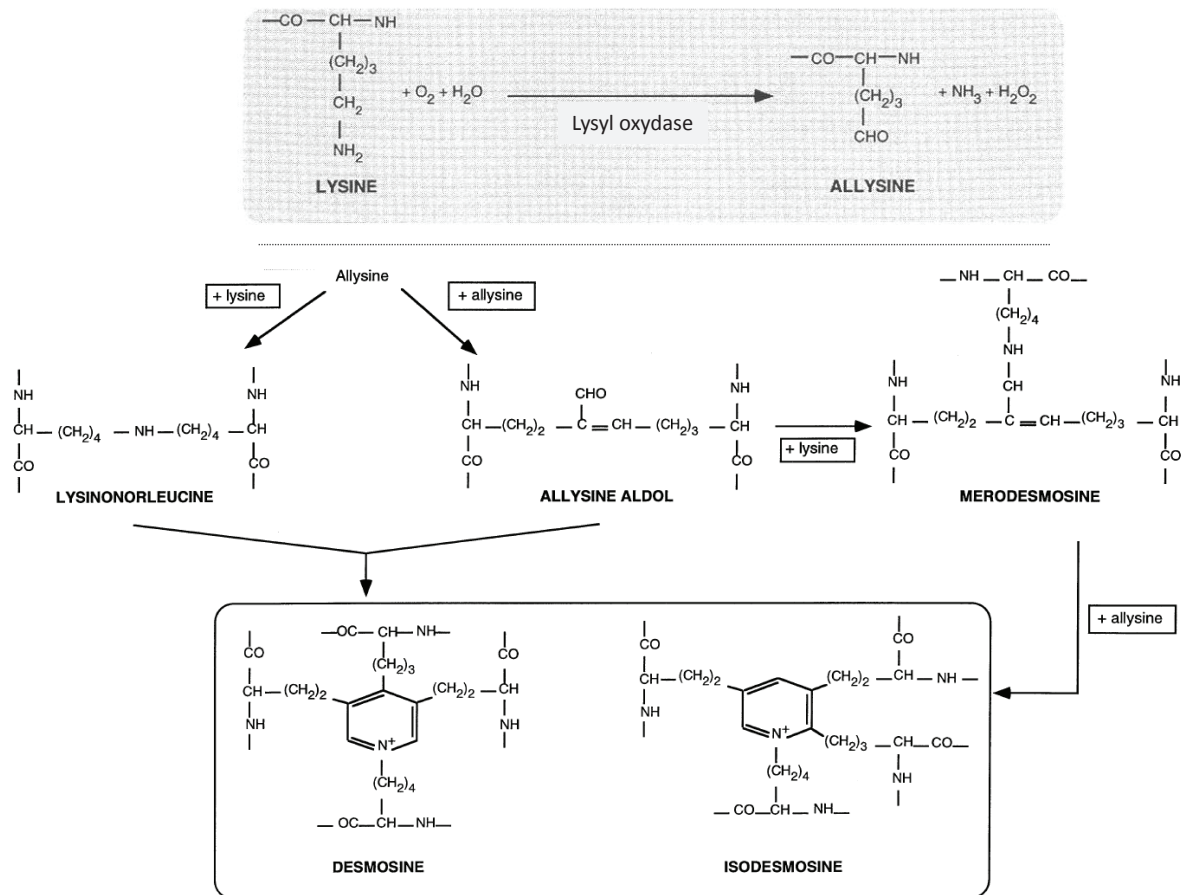


Figure 16: Formation des liaisons croisées de l'élastine. La réaction est catalysée par la lysyl oxydase qui convertit la lysine en allysine. Les condensations spontanées entre la lysine et l'allysine conduit à la formation de différents types de liaisons croisées incluant les liaisons tétra-fonctionnelles regroupant la desmosine et l'isodesmosine (Vrhovski and Weiss 1998).

Dans la TE, il existe deux types de domaines impliqués dans la formation des liaisons croisées. Tous deux enrichis en lysine, ils présentent des caractéristiques différentes. Les premiers, nommés domaines KA, présentent des résidus de lysine typiquement regroupés par deux ou trois, séparés par deux ou trois résidus d'alanine et formant une structure en hélice α , facilitant la formation de liaisons croisées entre les lysines de type tétra-fonctionnelles (Brown-Augsburger, Tisdale *et al.* 1995). Les domaines KA sont codés par les exons 6, 15, 17, 19, 21, 3, 25, 27, 29 et 31. L'autre type de domaine impliqué dans les liaisons croisées est le domaine KP, codé par les exons 4, 8, 10 et 12. Dans ces domaines KP, les paires de lysine sont séparées par un ou plusieurs résidus de proline, impliquant une contrainte stérique ne permettant pas la formation d'une structure hélicoïdale (Brown-Augsburger, Tisdale *et al.* 1995).

Environ 88% de l'ensemble des résidus de lysine de la TE, couvrant 16 domaines, sont impliqués dans la formation des liaisons croisées (Kozel, Rongish *et al.* 2006). La région, couvrant les domaines 19-25, contient un nombre particulièrement élevé de liaisons croisées. Le point de contact initial implique le résidu K353 du domaine 19 (Dyksterhuis, Baldock *et al.* 2007). Une liaison croisée a bien été caractérisée : elle implique les domaines 19 et 25 de deux chaînes d'élastine antiparallèles liées par des desmosines, qui sont pontées par des liaisons lysinonorleucine avec le domaine 10 d'une troisième chaîne (Brown-Augsburger, Tisdale *et al.* 1995). De plus, il peut y avoir des liaisons intramoléculaires au niveau des domaines 12 à 14 de l'extrémité N-terminale de la TE (Mithieux and Weiss 2005). Bien que la réticulation impose des restrictions sur la structure de l'élastine, la fibre réticulée conserve, néanmoins, une hydratation et une flexibilité en raison du désordre imposé par le squelette carboné du monomère de la TE (Bochicchio and Pepe 2011). La présence des liaisons croisées rend les fibres élastiques insolubles et stables sous l'étirement mécanique. Les fibres élastiques deviennent également plus résistantes à la protéolyse en raison de l'inaccessibilité des sites de clivage dans la structure réticulée (Heinz, Jung *et al.* 2012). Inversement, l'inhibition de la réticulation est corrélée à une augmentation de la fragmentation de l'élastine (Romero, Tinker *et al.* 1986). Par conséquent, l'étape de réticulation est indispensable à la formation de fibres élastiques complètes et fonctionnelles, dites matures.

L'assemblage complexe des fibres élastiques aboutit à une structure fonctionnelle (**Figure 17**). La fonctionnalité des fibres élastiques est partiellement jugée par une dimension physique mécanique : l'élasticité.

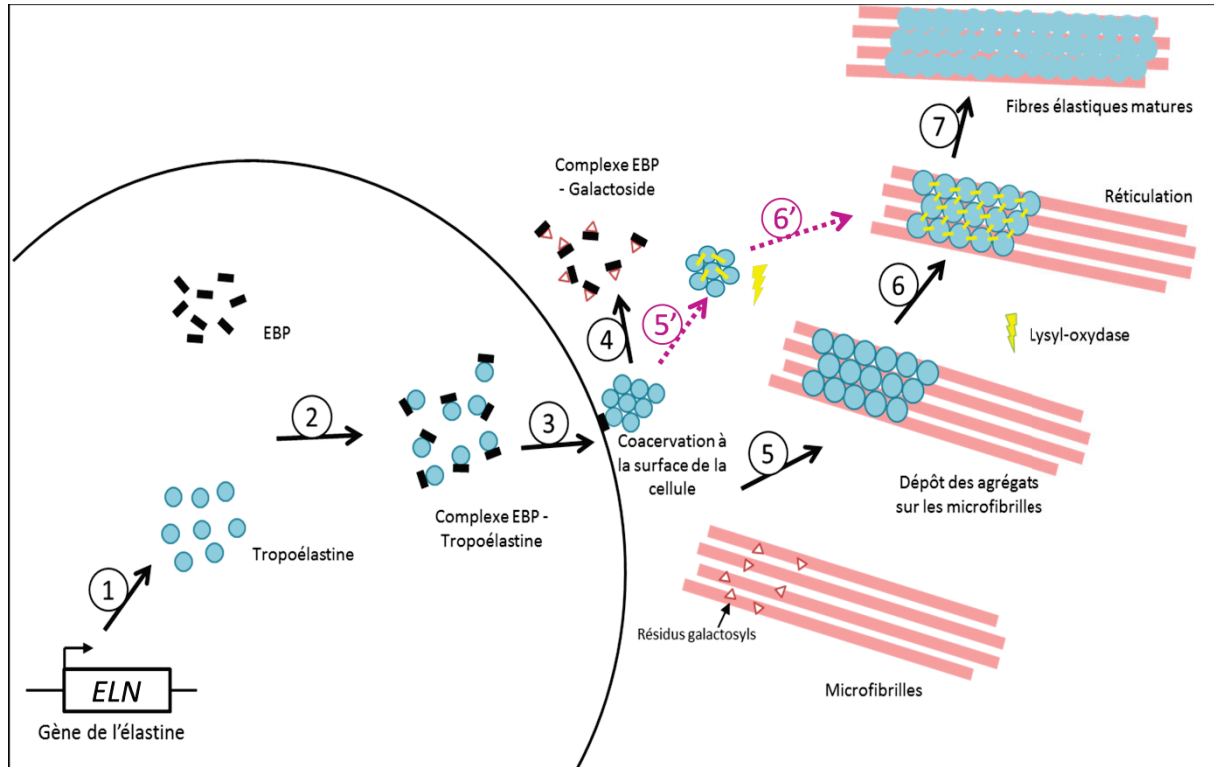


Figure 17: Schéma récapitulatif de la formation des fibres élastiques. 1 : Synthèse de la tropoélastine à partir du gène *ELN*. 2 : Fixation de la tropoélastine à l'EBP (*Elastin Binding Protein*). 3 : Transport du complexe EBP-tropoélastine vers l'espace extracellulaire. 4 : Libération de la molécule de tropoélastine du complexe par les résidus galactosyls présents à la surface des microfibrilles puis coacervation des monomères de tropoélastine encore attachés à la surface de la cellule. A cette étape, deux hypothèses ont été émises dans la littérature : la première serait que les coacervats se déposent sur les microfibrilles (5), avant d'être réticulés par les lysyl-oxydases (6) ; alors que la deuxième hypothèse serait que les coacervats sont d'abord réticulés dans l'espace extracellulaire (5'), avant d'être déposés sur les microfibrilles (6'). Ce processus de dépôt et de réticulation donne lieu à la formation de fibres élastiques matures (7).

V. Propriétés mécaniques de la tropoélastine humaine et de l'élastine insoluble

L'élastine mature est une protéine très stable avec une demi-vie estimée à 74 ans. Elle constitue près de 90 % des fibres élastiques et est responsable des propriétés élastiques et mécaniques de ces structures. Le module d'élasticité des fibres élastiques, appelé module d'Young, varie généralement entre 300 et 600 kPa et peut descendre à 100 kPa pour l'élastine des parois artérielles, soulignant la nature versatile de ces structures au sein de la MEC (Mithieux and Weiss 2005) (Almine, Bax *et al.* 2010). Les fibres élastiques sont capables de subir des milliards de cycles d'étirement et de relaxation sans la moindre défaillance mécanique (Keeley, Bellingham *et al.* 2002). Bien que le mécanisme d'élasticité ne soit pas complètement élucidé, il semblerait que l'étirement de l'élastine résulte en une structure plus ordonnée et que sa relaxation, d'origine entropique, soit possible seulement si la protéine est capable de revenir à un état désordonné (Vrhovski and Weiss 1998). Cette élasticité est due aux propriétés élastiques intrinsèques du monomère de TE (Baldock, Oberhauser *et al.* 2011).

V.1. Les propriétés mécaniques de la tropoélastine humaine

Les expériences d'étirement, par microscopie à force atomique sur une molécule de TE, révèlent que le monomère est un ressort presque parfait avec un comportement élastique idéal (absence de boucle d'hystérésis) (**Figure 18**) (Baldock, Oberhauser *et al.* 2011). Capable de s'étirer, de manière réversible, jusqu'à huit fois sa longueur au repos, d'environ 20 nm à environ 160 nm, la TE ne présente aucune hystérésis sur plusieurs cycles d'étirement et de relaxation. Avec un module d'Young d'environ 3 kPa, la TE est la protéine monomérique la plus élastique et extensible connue. La réticulation du monomère en une structure polymérique réduit l'extensibilité et augmente la rigidité.

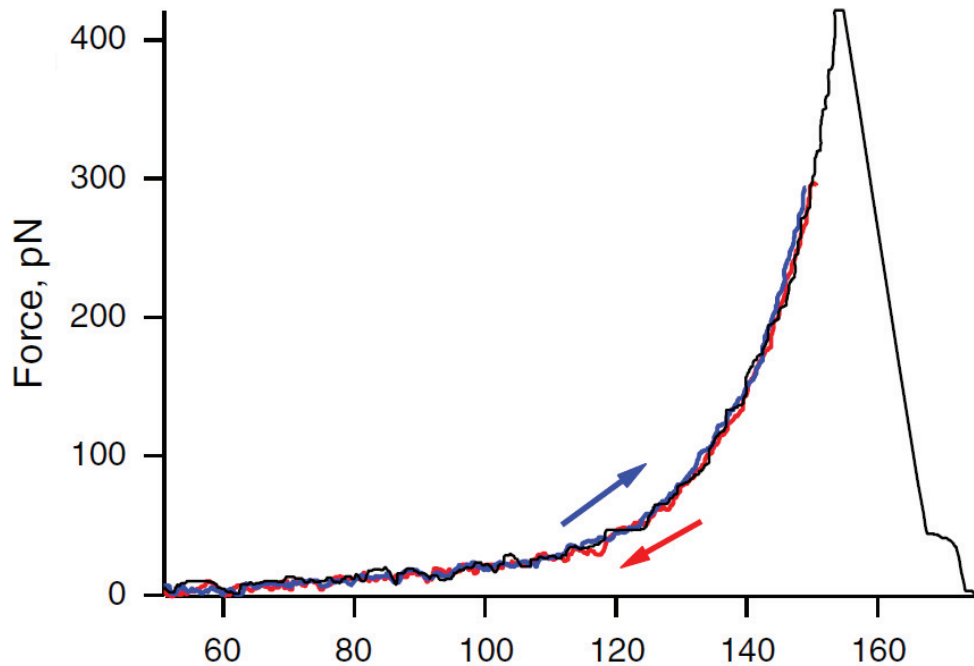


Figure 18 : Expérience d'étirement, par microscopie à force atomique, sur une molécule de tropoélastine. La molécule de TE a été étirée (courbe bleue) puis relâchée (courbe rouge) deux fois et étirée une nouvelle fois dans le but de la détacher du support (courbe noire). Cette dernière courbe présente un seul pic de force de détachement conforme à l'étirement d'une seule molécule (Baldock, Oberhauser *et al.* 2011).

V.2. Les modèles d'élasticité

Derrière les propriétés élastiques remarquables de l'élastine, la force motrice fondamentale est d'origine entropique. L'étirement diminue l'entropie du système alors que la relaxation entraîne une augmentation spontanée de l'entropie à son niveau maximal. Deux grandes catégories de modèles ont été proposées : celle dans laquelle l'élastine est considérée comme étant isotrope et dépourvue de structure, et celle dans laquelle l'élastine est considérée comme étant anisotrope avec des régions structurées (**Figure 19**) (Vrhovski and Weiss 1998).

Le modèle des chaînes aléatoires considère l'élastine comme un réseau constitué de chaînes pontées de manière aléatoire, qui sont en perpétuel mouvement dû à un état entropique élevé. Pendant l'étirement, les chaînes s'orientent, ce qui limite leur liberté conformationnelle et diminue ainsi l'entropie totale du système (Hoeve and Flory 1974).

Inversement, le modèle de la goutte liquide suggère que les monomères sphériques et globulaires de TE sont réticulés pour former une matrice tridimensionnelle. Pendant l'étirement, la déformation de la matrice expose les domaines hydrophobes des monomères de TE, enfouis dans la structure, au solvant contribuant à la diminution de l'entropie du système. La force de rappel est conduite par une augmentation de l'entropie dans le processus inverse (Weis-Fogh and Anderson 1970).

Une variation du modèle précédent considère les monomères de TE comme étant fibrillaires. Le modèle « oiled-coil » est constitué d'unités fibrillaires alternants avec des hélices α , des domaines de réticulation et de larges bobines (oiled-coil), comprenant des unités répétitives de la TE, en particulier l'hexapeptide APGVGV, le pentapeptide VPGVG et le tétrapeptide VPGG, dans lesquels les résidus de glycine sont exposés au solvant alors que les résidus de valine, proline ainsi que les autres résidus hydrophobes sont enfouis dans la structure (Gray, Sandberg *et al.* 1973). Les régions réticulées sont rigides tandis que les régions hydrophobes sont flexibles. Pendant l'étirement, comme pour le modèle de la goutte liquide, le cœur hydrophobe est exposé au solvant, entraînant une diminution de l'entropie du système.

Enfin, dans un dernier modèle, le modèle fibrillaire, l'élasticité provient des propriétés des structures spirales- β régulières, comprenant des coudes- β répétitifs (Urry, Long *et al.* 1974). Ces derniers sont formés par des séquences répétitives régulières (VPGVG, VPGG et APGVGV) de la TE. Les coudes- β agissent comme des espaceurs entre les coudes des spirales- β , laissant les segments peptidiques dans un état de conformation libre. Pendant l'étirement, l'entropie de ces segments peptidiques diminue, fournissant la force de rappel nécessaire pour l'élasticité.

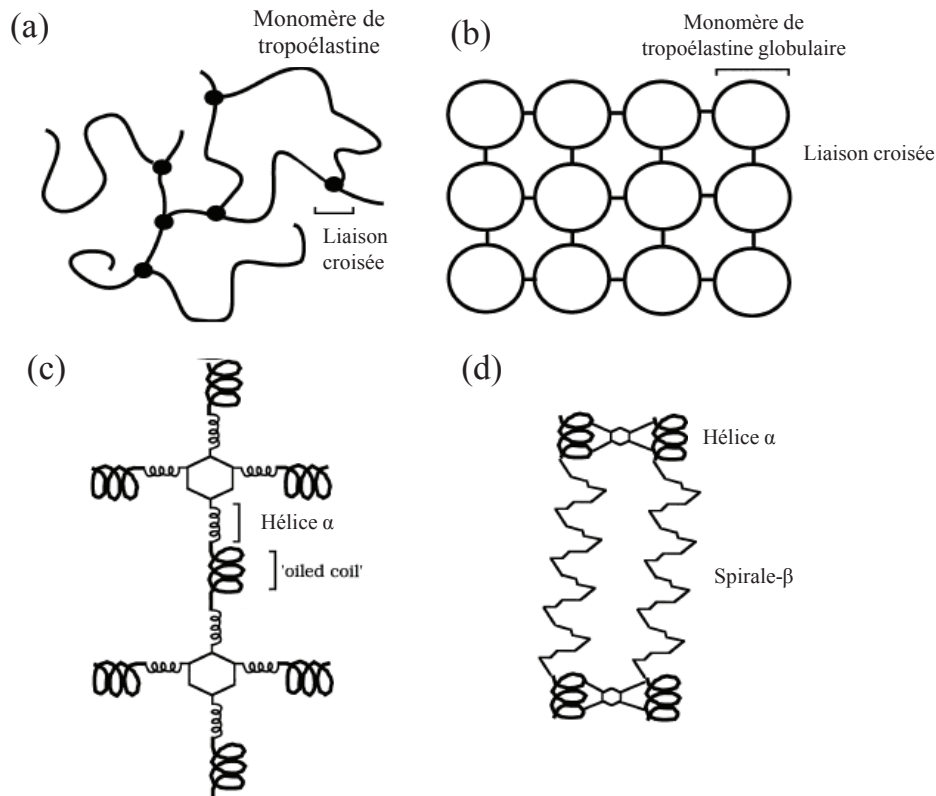


Figure 19: Modèles structuraux de l'élastine. a) Modèle des chaînes aléatoires. b) Modèle de la goutte liquide. c) Modèle « oiled-coil ». d) Modèle fibrillaire (adaptée de Vrhovski and Weiss 1998).

Tamburro *et al.* ont également proposé un modèle basé sur les coudes- β , situés dans les séquences répétitives de type GXGGX (Tamburro, Guantieri *et al.* 1991). Les coudes formés de résidus de glycine sont plus labiles que leurs homologues de proline, et sont capables de s'interconvertir donnant lieu à des coudes- β dynamiques, qui glissent le long de la chaîne polypeptidique (Debelle and Tamburro 1999). Dans ce modèle, la chaîne fluctue librement et le système est majoritairement non structuré. La force de rappel est similaire à celle proposée par le modèle des chaînes aléatoires. Plus récemment, les travaux de Daggett et Cross ont souligné l'existence de structures en spirales β à l'état replié du polypeptide (Li, Alonso *et al.* 2001 ; Gross, Possart *et al.* 2003).

L'altération des propriétés fonctionnelles des fibres élastiques engendre des modifications dans les propriétés mécaniques des tissus, contribuant à l'apparition de symptômes plus ou moins délétères détaillés par la suite. Cette perte d'élasticité peut être attribuée soit à une mutation sur le gène de l'élastine (entraînant une diminution de sa synthèse ou une mauvaise conformation), à la présence de contaminants au sein de la fibre élastique (lipides, calcium) ou à sa dégradation par des enzymes protéolytiques.

VI. Pathologies génétiques dues à un déficit en élastine

Les mutations ou délétions dans le gène de l'élastine conduisent au développement de plusieurs pathologies humaines rares. Les pathologies génétiques associées directement au gène de l'élastine sont la sténose supravalvulaire aortique (SVAS pour *Supravalvular Aortic Stenosis*), le syndrome de Williams-Beuren (SWB) et le cutis laxa autosomique dominant (CLAD) (Baldwin, Simpson *et al.* 2013).

VI.1. Sténose supravalvulaire aortique

L'incidence de la sténose supravalvulaire aortique (SVAS, OMIM 185500) est estimée à 1 pour 20 000 naissances. Il peut s'agir d'un cas sporadique ou d'une malformation transmise sur le mode autosomique dominant.

Cette pathologie se caractérise par un rétrécissement ou une obstruction de l'aorte ascendante, accompagnée par une augmentation de l'épaisseur artérielle par hyperprolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). La SVAS affecte fréquemment l'aorte ascendante mais peut toucher d'autres artères comme les artères pulmonaires, coronaires, rénales et les carotides (Baldwin, Simpson *et al.* 2013).

Bien que des formes non-congénitales de SVAS existent, la SVAS est généralement associée au syndrome de Williams-Beuren (décrit dans la partie V.1.2), caractérisé par un trouble complexe du développement.

La SVAS est due à des translocations, délétions ou mutations ponctuelles dans un allèle du gène de l'élastine (*ELN*), localisé sur le locus q11.23 du chromosome 7 (Urban, Riazi *et al.* 2002). Ces mutations conduisent à la synthèse d'une molécule d'élastine non fonctionnelle interférant dans l'assemblage des fibres élastiques, ou à l'apparition prématurée de codons STOP au niveau de la séquence du gène *ELN*. L'ARNm ainsi obtenu est instable et plus sensible à la dégradation, ce qui rend l'allèle de l'élastine non fonctionnel, d'où la diminution de 50% de la synthèse d'élastine (Urban, Zhang *et al.* 2001). De plus, le fait que l'haplo-insuffisance du gène *ELN* soit une cause sous-jacente de la SVAS non-syndromique, a été confirmée par l'identification de 7 nouvelles mutations dans le gène *ELN* chez 31 patients avec une SVAS non syndromique sporadique ou familiale (Micale, Turturo *et al.* 2010).

Au niveau structural, la région touchée de l'aorte des patients atteints de SVAS se caractérise par un épaississement de l'intima suite à une migration des CMLV, conduisant à un rétrécissement de l'aorte et une désorganisation des lames élastiques de la média (Brooke, Habashi *et al.* 2008). Les régions saines de l'aorte présentent tout de même un épaississement de la paroi aortique, malgré un diamètre intraluminal normal. Des complications peuvent se produire dans le cas de SVAS sévères comme l'hypertrophie ventriculaire gauche, l'ischémie myocardique, généralement au cours d'anesthésies, et des accidents vasculaires cérébraux quand la sténose affecte les artères cérébrales (Deo, Burkhart *et al.* 2013).

Les cellules souches pluripotentes induites (iPS pour *Induced pluripotent stem cells*) des patients SVAS, exposant les caractéristiques de la SVAS, ont été générées dans le but d'étudier la pathogenèse pour d'éventuelles cibles thérapeutiques. Cette étude révèle que les cellules musculaires lisses touchées présentent des réseaux de faisceaux de filaments d' α -actine moins bien organisés par rapport aux cellules témoins. En tant que cible thérapeutique potentielle, cette étude prévoit d'inhiber la surprolifération des cellules musculaires lisses en diminuant la signalisation ERK1/2 (Ge, Ren *et al.* 2012). Une autre thérapie par aortoplastie a été rapportée (Shin, Jhang *et al.* 2011).

VI.2. Syndrome de Williams-Beuren

Le syndrome de Williams-Beuren (SWB, OMIM 194050) a été décrit pour la première fois par JCP Williams et AJ Beuren (Williams, Barratt-Boyes *et al.* 1961) (Beuren, Apitz *et al.* 1962). L'incidence de ce syndrome est estimée à 1 pour 7500 naissances. Il se produit généralement de façon sporadique.

Les caractéristiques associées à ce syndrome sont nombreuses et incluent un retard psychomoteur, des difficultés d'apprentissage, une dysmorphie faciale caractéristique, une hypercalcémie, un métabolisme anormal du glucose, une hypertrophie ventriculaire gauche, une cardiopathie, une sténose des branches de l'artère pulmonaire, une SVAS localisée ou diffuse et un pourcentage élevé d'hypertension artérielle (40-70%). Les artères des patients du SWB sont plus épaisses, même au niveau des zones non sténotiques. Suivant les individus, les atteintes du système vasculaire peuvent varier fortement allant de l'absence de tout signe clinique cardiovasculaire à la mortalité infantile.

Dans le SWB, seulement 15% d'élastine est sécrétée contrairement à 50% dans le cas de la SVAS isolée (Dridi, Foucault Bertaud *et al.* 2005) (Pober 2010).

Le SWB est dû à une microdélétion de gènes contigus résultant de la suppression hémizygote de 1,5 à 1,8 Mb du locus q11.23 du chromosome 7. Cette région englobe au moins 27 gènes dont celui de l'élastine, aboutissant à la perte d'un des allèles de l'élastine (Schubert 2009). Dans la majorité des cas, cette microdélétion apparaît *de novo*; elle peut être, néanmoins, d'origine héréditaire. La variabilité des symptômes du SWB peut s'expliquer soit par une variation dans la synthèse de l'élastine, soit par une variation dans l'expression des gènes flanquants la région affectée par la microdélétion. Parmi les gènes délétés, certains sont fortement exprimés dans le cerveau, comme les gènes *LIM1K*, *GTF2IRD2*, *CYLN2* et *GTF2I* impliqués dans les déficits de repérage spatio-temporel et dans la cognition. Par ailleurs, en 1999, Dridi *et al.* ont évalué les fibres élastiques dans le derme de 10 patients atteints du syndrome (Dridi, Ghomrasseni *et al.* 1999). Les analyses ont révélé la présence de fibres pré-élastiques et de fibres élastiques matures désorganisées chez les enfants atteints du SWB par rapport à cinq enfants en bonne santé. Néanmoins, les symptômes les plus délétères touchent l'appareil cardiovasculaire.

VI.3. Le cutis laxa autosomique dominant de classe 1

Le cutis laxa autosomique dominant de classe 1 (CLAD1, OMIM 123700) est une maladie du tissu conjonctif caractérisée par un vieillissement prématuré de la peau, défini par une perte d'élasticité et des rides en excès. L'incidence est non connue mais moins de 50 cas ont été rapportés dans la littérature. Le syndrome CLAD1 est une forme modérée de cutis laxa avec une atteinte systémique limitée (Marchase, Holbrook *et al.* 1980) (Sarkar, Kaur *et al.* 2002), bien que des hernies, anomalies de valves cardiaques, manifestations cardiovasculaires (sténose pulmonaire, dilatation et tortuosité artérielle et aortique) (Szabo, Crepeau *et al.* 2006), diverticules gastro-intestinaux et emphysèmes (Rodriguez-Revenga, Iranzo *et al.* 2004), puissent être associés.

L'histologie chez les patients CLAD1 révèle une perte, une fragmentation et une désorganisation importante des fibres élastiques entraînant une fragilisation et une perte d'élasticité du tissu conjonctif (Szabo, Crepeau *et al.* 2006).

Le syndrome CLAD1 est dû à une mutation hétérozygote du gène de l'élastine (*ELN*) sur le locus q11.23 du chromosome 7. Dans la plupart des cas, les patients portent des mutations dans le cadre de lecture à proximité de l'extrémité 3' du gène *ELN*, conduisant à une mutation faux-sens dans l'exon 36. L'élastine mutée au niveau du domaine 36 ne se lie pas correctement à la fibrilline-1, ce qui renforce son auto-assemblage et diminue, par conséquent, le dépôt de l'élastine mature sur les microfibrilles. Par ailleurs, il a été démontré que le défaut d'assemblage des fibres élastiques entraîne une régulation à la hausse de la voie de signalisation du TGF- β , stocké au sein des microfibrilles (Callewaert, Renard *et al.* 2011).

VII. Altération des tissus normaux adultes

VII.1. Les fibres élastiques dans les tissus âgés

VII.1.1. Dégradation des fibres élastiques au cours du vieillissement

L'accumulation de dommages par les protéines matricielles a longtemps été reconnue comme un facteur potentiel contribuant au déclin fonctionnel des tissus au cours du vieillissement (Bailey 2001). En raison de sa longue demi-vie et son faible taux de renouvellement, l'élastine est susceptible d'être dégradée par des mécanismes enzymatiques, chimiques et biophysiques.

L'accumulation des dommages oxydants par les macromolécules biologiques, telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques, semble jouer un rôle important dans le processus du vieillissement (Vijg and Campisi 2008). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*), O_2^- , H_2O_2 , 1O_2 et $\cdot OH$, sont les principaux agents de l'oxydation des protéines. Les ROS sont générés soit comme des produits du métabolisme normal actif, soit par des facteurs environnementaux comme le rayonnement UV (Yaar and Gilchrist 2007). Les perturbations dans l'homéostasie des fibres élastiques, suite à la transcription des MMP induite par les ROS, contribue au vieillissement des tissus. En plus de ces mécanismes anaboliques et cataboliques, les ROS sont connus pour agir directement sur les collagènes matriciels, mais l'influence de l'oxydation sur la structure et la fonction des composants des fibres élastiques reste peu connu. A ce jour, deux études ont traité la susceptibilité de l'élastine à être modifiée par les ROS : Umeda *et al.* ont caractérisé l'oxydation et la solubilisation de l'élastine par H_2O_2 en présence du cuivre Cu^{2+} (Umeda, Nakamura *et al.* 2001), tandis que Cantor *et al.* ont suggéré que l'exposition préalable aux ROS, pourrait augmenter la sensibilité des fibres élastiques à être dégradé par les élastases (Cantor, Shteyngart *et al.* 2006). Ces observations indiquent que l'oxydation *in vivo* pourrait, en partie, être responsable de la diminution du processus de réticulation.

En plus d'être dégradées en réponse à des mécanismes pro-oxydants, la structure et la fonction des fibres élastiques dans les tissus âgés peuvent être compromises par l'accumulation de liaisons croisées pathologiques.

L'intégrité structurale des fibres élastiques repose fortement sur la formation des liaisons croisées, régulées au cours du développement (Bailey 2001).

Au cours du vieillissement, ces liaisons croisées intra- et inter-moléculaires, cèdent la place à une accumulation incontrôlée de glucose et de liaisons croisées dérivées de métabolites du glucose. Ces réticulations non enzymatiques subissent des modifications successives, aboutissant à la formation de produits de glycation avancés (AGE *pour Advanced-glycosylation end products*), qui augmentent la rigidité du tissu, inhibent l'assemblage du collagène et altèrent la liaison collagène/cellule (Paul and Bailey 1996). Ces liaisons croisées pathologiques s'accumulent avec le vieillissement et, de façon plus précoce, avec des pathologies comme le diabète. Peu d'études ont été faites concernant l'impact de la formation des AGE sur la fonction des fibres élastiques (Bailey 2001). Shapiro *et al.* ont émis l'hypothèse que la formation des AGE au sein des protéines matricielles contribue à l'augmentation de la rigidité artérielle liée au vieillissement (Shapiro, Endicott *et al.* 1991).

La structure des fibres élastiques peut également être modifiée par la calcification, la racémisation de l'acide aspartique et l'accumulation de lipides (Robert, Robert *et al.* 2008). L'accumulation de calcium dans les vaisseaux sanguins est fortement liée à l'élastine. La liaison avec le calcium peut aussi jouer un rôle dans l'absorption des lipides par les fibres élastiques au cours du vieillissement de la paroi artérielle. En effet, le mécanisme de liaison lipide-calcium est impliqué dans les interactions avec les domaines hydrophobes de la TE, entraînant des changements conformationnels, pouvant modifier les propriétés mécaniques de l'élastine (Green, Mansfield *et al.* 2014). En plus de la liaison des ions et des biomolécules extracellulaires, l'acide L-aspartique se convertit spontanément en acide D-aspartique au sein des protéines des fibres élastiques. A la fois l'élastine et les fibrillines accumulent l'acide D-aspartique issu de cette racémisation, mais les conséquences sur la structure et la fonction des fibres élastiques âgées ne sont pas connues (Bailey 2001).

VII.1.2. Le vieillissement vasculaire

Les vaisseaux sanguins font partie des organes les plus touchés au cours du vieillissement. Le vieillissement vasculaire affecte essentiellement les grosses artères, les artères musculaires alors que les petites artères sont moins touchées. Les principales altérations observées au cours du vieillissement artériel sont l'augmentation de la lumière artérielle, l'épaississement de l'intima et de la média, le dysfonctionnement des cellules endothéliales et l'augmentation de la rigidité de la paroi artérielle (**Figure 20**) (Lakatta and Levy 2003).

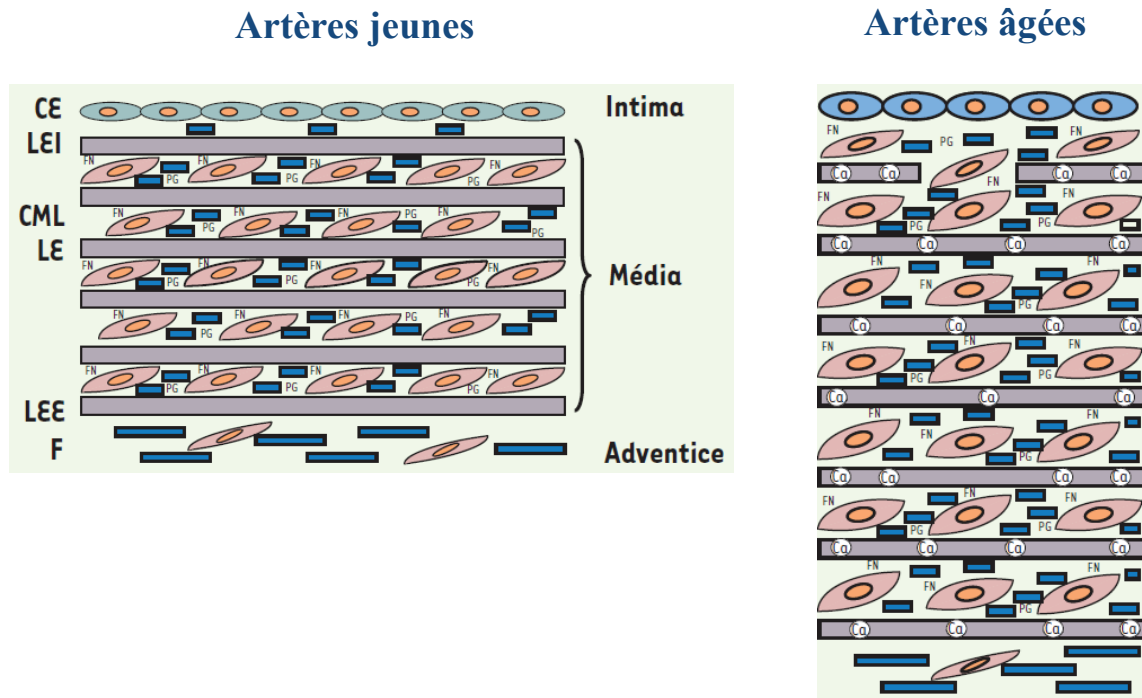


Figure 20: La matrice extracellulaire des artères jeunes et ses modifications au cours du vieillissement. Les artères sont organisées en trois couches concentriques, l'intima, la média et l'adventice et contiennent les macromolécules matricielles telles que les collagènes, les protéoglycanes (PG), l'élastine et les glycoprotéines de structure dont la fibronectine (FN) et les glycoprotéines associées aux fibres élastiques. Les fibres élastiques sont organisées en lames fenestrées (LE lame élastique, LEI lame élastique externe, LEE lame élastique externe). La MEC est synthétisée par les cellules endothéliales (CE), les cellules musculaires lisses (CML) et les fibroblastes (F). Au cours du vieillissement, l'intima et la média s'épaississent, les cellules musculaires lisses s'hypertrophient, les quantités de collagène et de fibronectine augmentent, de même que la quantité de calcium lié aux fibres élastiques. Ces dysfonctions conduisent à la rigidification des artères (adaptée de Jacob 2006).

L'épaississement de l'intima est dû à la migration des CMLV et à la synthèse de la MEC par ces cellules. L'épaississement de la média est le résultat de l'hypertrophie des CMLV et de l'accumulation des collagènes et de la fibronectine, étant directement liée à la formation des AGE. Du fait de l'augmentation des collagènes et de la fibronectine, la proportion relative d'élastine diminue. Cette diminution, corrélée à l'augmentation du nombre de collagènes, à laquelle s'ajoute la fixation du calcium à l'élastine, participe à l'accroissement de la rigidité de la paroi artérielle au cours du vieillissement (Jacob 2006). En l'absence de tout état pathologique, l'accroissement de la rigidité artérielle s'associe à une augmentation de la pression artérielle systolique et à une diminution de la pression artérielle diastolique, résultant en une augmentation de la pression pulsée.

Ces altérations des grandes artères, observées avec le vieillissement, font de l'âge un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires. Le vieillissement artériel peut aussi être influencé par des facteurs environnementaux et nutritionnels. En effet, une déficience en fer ou en acide ascorbique favorise le vieillissement artériel, alors qu'une restriction calorique le retarde (Fornieri, Taparelli *et al.* 1999).

VII.1.3. Le vieillissement cutané

Le vieillissement cutané résulte de deux processus biologiques distincts qui peuvent être concomitants : le vieillissement intrinsèque lié au passage du temps, et le vieillissement extrinsèque influencé par les facteurs environnementaux dont les plus connus sont l'exposition aux UV, le tabagisme, l'alcool, la malnutrition et la pollution atmosphérique (Langton, Sherratt *et al.* 2010).

Le vieillissement intrinsèque de la peau est un processus lent qui engendre des modifications dans la structure de la peau et altère la fonction tissulaire sans facteurs biologiques, chimiques ou physiques supplémentaires. Au niveau clinique, les caractéristiques de la peau intrinsèquement âgée sont peu visibles avant la vieillesse (> 60 ans) où, bien qu'impeccable et lisse, la surface de la peau est marquée par des ridules et des lignes d'expression exagérées (Montagna, Kirchner *et al.* 1989). Au niveau histologique, la peau intrinsèquement âgée présente une atrophie dermique et épidermique (perte des crêtes épidermiques) avec une diminution du nombre de mastocytes et de fibroblastes réduisant la synthèse de collagène et favorisant la production de MMP (**Figure 21**) (Varani, Warner *et al.* 2000). La jonction dermo-épidermique est modifiée structurellement et le transfert d'éléments nutritifs est réduit entre le derme et les couches de l'épiderme. Au niveau fonctionnel, la peau intrinsèquement âgée est sèche, plus fragile et moins élastique qu'une peau jeune (Katzberg 1958). A l'inverse, la peau extrinsèquement âgée est marquée par des rides profondes, une hyperpigmentation sous la forme de taches et une perte marquée d'élasticité. L'influence environnementale majeure à l'origine du vieillissement extrinsèque, et qui s'ajoute au vieillissement intrinsèque, est l'exposition chronique aux UV (Fisher, Datta *et al.* 1996). L'exposition chronique aux UV, qui est responsable d'environ 80% des effets du vieillissement de la peau, en particulier le visage (zone la plus exposée), est appelée photo-vieillesse (Uitto 1997).

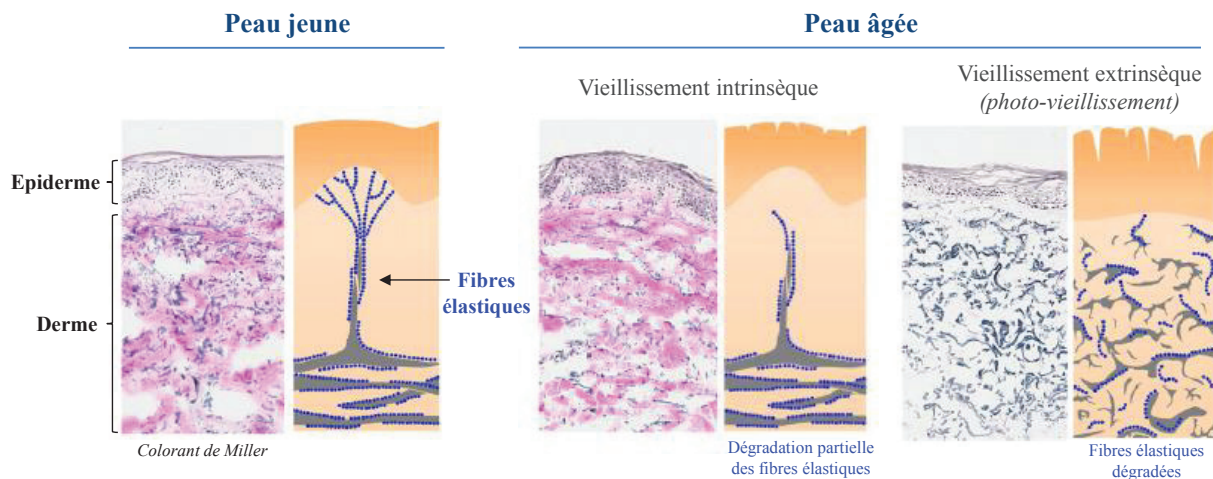


Figure 21: Dégradation des fibres élastiques au cours du vieillissement cutané. La peau intrinsèquement âgée présente une atrophie dermique et épidermique (perte des crêtes épidermiques) avec modification de la jonction dermo-épidermique. La peau extrinsèquement âgée présente de nombreuses altérations au niveau de l'épiderme (atrophie) mais surtout du derme avec une hyperplasie des fibres élastiques, une diminution de la quantité de microfibrilles et une modification de leur architecture (adaptée de Naylor, Watson *et al.* 2011).

L'exposition aiguë de la peau au rayonnement UV déclenche des érythèmes solaires, l'altération de la pigmentation, une inflammation, une immunosuppression et des dommages dans le tissu conjonctif dermique, provoquant le vieillissement prématuré de la peau et, dans les cas les plus extrêmes, le cancer de la peau. Contrairement à la peau intrinsèquement âgée, le derme est plus endommagé dans la peau extrinsèquement âgée (**Figure 21**). L'épiderme est caractérisé par une atrophie et une perturbation de la différenciation normale des kératinocytes. De nombreuses caractéristiques histologiques du photo-vieillessement sont plus visibles dans le derme. En effet, le derme présente des perturbations considérables dans le réseau de fibres élastiques, notamment une hyperplasie des fibres élastiques dans le derme réticulaire. L'élastine est modifiée par l'accumulation de N-(carboxy-méthyl) lysine, un produit de glycosylation induit par atteinte oxydante des protéines matricielles. Le niveau d'exposition au soleil détermine l'ampleur de la réponse hyperplasique. Cette accumulation de matériel élastique amorphe est appelée élastose solaire (Bernstein, Chen *et al.* 1994). Par ailleurs, l'examen du derme papillaire supérieur, adjacent à la jonction dermo-épidermique, révèle une diminution de la quantité de microfibrilles et une altération de leur architecture, en particulier la fibrilline-1, qui est l'un des premiers constituants du réseau microfibrillaire à être endommagé par l'exposition aux UV.

Par conséquent, la fibrilline-1 est considérée comme un marqueur précoce du photo-vieillissement (Watson, Craven *et al.* 2001). La perte de l'intégrité de la fibre élastique, en réponse à l'exposition aux UV, entraîne une réduction marquée de l'élasticité de la peau. Une perte similaire se produit également au cours du vieillissement intrinsèque, mais généralement associée à une perte progressive de l'élasticité. Les modifications mécaniques qui ont lieu reflètent des changements dégénératifs structurels, incluant la détérioration du manteau microfibrillaire, entourant les fibres élastiques, et la dégradation protéolytique du noyau d'élastine (Sherratt 2009).

VII.2. Les fibres élastiques dans le processus de cicatrisation

La peau est un organe important du corps humain par sa fonction d'interface entre le corps et l'environnement extérieur. Les lésions cutanées déclenchent un processus de cicatrisation complexe, orchestrant les cellules, les protéines matricielles et les facteurs de signalisation dans le but de rétablir la fonction barrière de la peau. Le processus de cicatrisation est optimisé pour assurer une cicatrisation rapide et efficace. L'élastine confère à la peau de nombreuses propriétés mécaniques et biologiques. Dans la cicatrisation des plaies, l'élastine manque sévèrement, seulement un réseau de fibres élastiques désorganisées est présent après la formation de la cicatrice, contribuant à diminuer les propriétés physiques du tissu comparé à une peau saine (Almine, Wise *et al.* 2012).

VII.2.1. Les étapes de cicatrisation

Le processus de cicatrisation comporte trois phases distinctes qui se chevauchent partiellement : une phase inflammatoire, une phase de réparation et une phase de remodelage (**Figure 22**).

L'inflammation consiste en la formation d'un caillot de sang après la lésion cutanée, puis à la migration des cellules qui participent à la réaction inflammatoire.

La stimulation de la cascade de coagulation et l'activation des plaquettes permettent la formation d'un caillot de fibrine, obtenu par clivage du fibrinogène par la thrombine (Metcalfé and Ferguson 2007). Le caillot de fibrine contient des fibres de fibrine insolubles ainsi que des plaquettes, qui arrêtent l'hémorragie des vaisseaux sanguins endommagés.

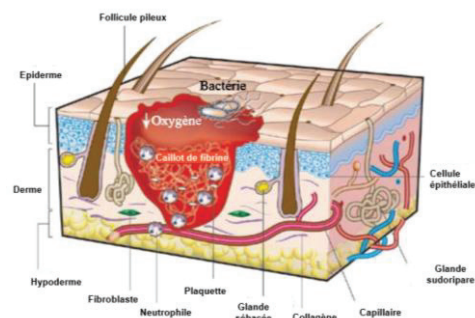
De plus, le caillot de fibrine est riche en fibronectine et vitronectine, ce qui facilite l'infiltration des cellules inflammatoires au site de la plaie (Krafts 2010). Les monocytes sont les premières cellules inflammatoires localisées dans le site de la plaie ; elles participent au recrutement des neutrophiles (Egozi, Ferreira *et al.* 2003). Cet afflux de neutrophiles protège la plaie des agents infectieux et permet l'élimination des débris cellulaires et de la MEC. La population de neutrophiles atteint son niveau maximal dans les premières 48h suivant la blessure, et est remplacée par des macrophages, différenciés à partir des monocytes. Dans la phase d'inflammation, les macrophages continuent l'élimination des débris cellulaires et particules étrangères. Ils jouent également un rôle pivot dans la transition entre l'inflammation et la réparation. Les macrophages sécrètent des facteurs de croissance qui dictent le recrutement des cellules essentielles à la réparation, à savoir les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules endothéliales (Krafts 2010).

La réparation consiste à remplacer les composants dermiques et à réparer l'épiderme. Les fibroblastes migrent vers la plaie où ils prolifèrent et déposent une matrice provisoire sous la forme d'un tissu de granulation (Grinnell 1982). Le tissu de granulation est une structure amorphe, composée de vaisseaux sanguins, de MEC et de fibroblastes. Ce tissu remplace le caillot de fibrine permettant l'infiltration des cellules. Le rôle principal des fibroblastes est de déposer des composants de la MEC, tels que les collagènes de type I et III, qui forment le noyau central de la cicatrice mature (Lovvorn, Cheung *et al.* 1999). A ce stade, sous l'action du TGF- β 1, de nombreux fibroblastes se différencient en myofibroblastes conférant au tissu de granulation des propriétés contractiles facilitant la fermeture de la plaie. Simultanément, la ré-épithélialisation commence. Les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme, environnant la zone lésée, migrent, prolifèrent et se différencient pour former un néo-épiderme (Gurtner, Werner *et al.* 2008). En même temps, les kératinocytes sécrètent et déposent les composants nécessaires à la reconstruction de la lame basale. Un épithélium stratifié et kératinisé est formé et la fonction de barrière cutanée est rétablie. Par ailleurs, cette ré-épithélialisation est renforcée par la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules du derme, en particulier les fibroblastes (Smola, Thiekotter *et al.* 1993).

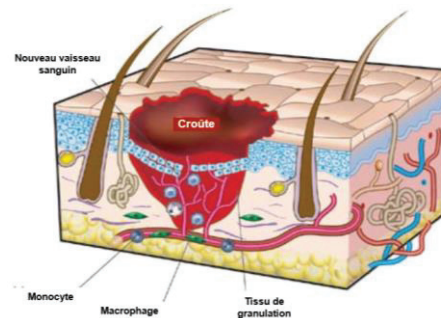
Le remodelage de la cicatrice mature constitue la dernière phase de cicatrisation. La cicatrice acellulaire et fibreuse se compose principalement de composants de la MEC, et est dépourvue de la plupart des cellules du derme (Broughton, Janis *et al.* 2006).

La synthèse de collagènes par les fibroblastes augmente considérablement pour combler la MEC du derme suite à la destruction du tissu (Lovvorn, Cheung *et al.* 1999). Le remodelage de la cicatrice par les protéases, telles que les MMP, se poursuit plusieurs mois après la blessure. La cicatrice, formée essentiellement de collagène, récupère la rigidité de la peau, mais présente une résistance à la traction plus faible, qui est due aux variations dans la composition et l'organisation matricielle par rapport à une peau saine (Levenson, Geever *et al.* 1965). De plus, les annexes cutanées présentes dans une peau normale, dont les follicules pileux, les glandes sébacées et sudoripares, ne sont pas régénérées, diminuant les fonctions périphériques de la peau.

A) Inflammation



B) Réparation



C) Remodelage

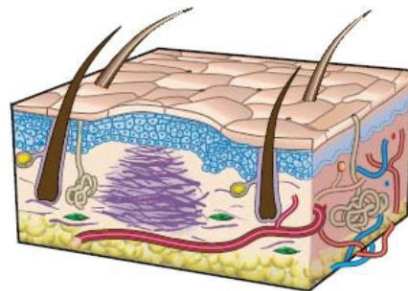


Figure 22: Les étapes de cicatrisation de la peau d'un adulte. A) L'étape d'inflammation dans laquelle un caillot de fibrine est formé et les cellules inflammatoires migrent vers la zone lésée. B) La réparation consiste en la ré-épithélialisation et l'angiogenèse d'une matrice provisoire. C) Le remodelage est l'étape finale de la cicatrisation. Les facteurs de remodelage matriciels remanient le tissu cicatriciel (adaptée de Almine, Wise *et al.* 2012).

VII.2.2. L'élastine dans la cicatrisation

Au cours du processus de cicatrisation, l'élastine est faiblement exprimée ne permettant pas la formation d'un réseau de fibres élastiques fonctionnelles dans la cicatrice mature. Par conséquent, cette dernière voit ses propriétés physiques diminuées en comparaison avec une peau saine. La production d'élastine est absente à l'âge adulte, mais sa synthèse est induite suite à une blessure ou dans une pathologie. De plus, son expression est influencée par une gamme de facteurs solubles, en particulier, l'IGF-1, le TNF- α , l'interleukine-1 β et le TGF- β (Vrhovski and Weiss 1998). Malgré la hausse de l'expression de l'élastine au début de la blessure, le dépôt de l'élastine dans le derme est aberrant. L'élastine n'est détectée que plusieurs mois après les premières phases de cicatrisation (Raghunath, Bachi *et al.* 1996). La formation d'un réseau de fibres élastiques altérées contribue à une diminution de l'élasticité et de la résilience de la cicatrice mature.

L'élastine est reconnue comme étant un modulateur de la physiologie cellulaire, de par sa capacité à atténuer la contraction de la plaie et à améliorer la régénération dermique (Rnjak, Wise *et al.* 2011). En effet, les forces contractiles cellulaires sont connues pour être influencées par l'élasticité du substrat sous-jacent, qui interfère avec la perception et la transmission du stress myofibroblastique permettant de réduire la contraction de la plaie (Hinz 2007). La différenciation myofibroblastique est diminuée sur des supports plus élastiques. De plus, la dédifférenciation peut être induite *in vitro* en augmentant l'élasticité d'un support de culture cellulaire (Kloxin, Benton *et al.* 2010). Il est généralement admis que les myofibroblastes disparaissent du lit de la plaie par apoptose; il reste à voir si la dédifférenciation des cellules peut se produire *in vivo*. Il a également été démontré que l'élastine peut empêcher la différenciation des fibroblastes proliférants en myofibroblastes contractiles, ce qui réduit la contraction de la plaie et module la formation du tissu cicatriciel (de Vries, Middelkoop *et al.* 1994). Par conséquent, l'élastine exerce de multiples fonctions au cours de la cicatrisation, en vertu de ses propriétés mécaniques et de signalisation. La restauration d'un réseau de fibres élastiques intactes et fonctionnelles est donc essentielle pour retrouver la fonction complète de la peau après une blessure.

A ce jour, aucun traitement n'existe pour les pathologies génétiques dues à un déficit en élastine (SVAS, SWB, CLAD). Seules des interventions chirurgicales, parfois dès l'enfance, permettent de limiter le développement des symptômes les plus délétères. De plus, la présence des fibres élastiques dans un grand nombre de tissus et son renouvellement quasi-nul suite à une blessure, en font un enjeu majeur pour l'ingénierie tissulaire et la pharmacologie, où le défi sera d'induire, renforcer ou réparer les fibres élastiques endommagées. Une avancée majeure dans le cadre des développements biotechnologiques autour des fibres élastiques est sans doute l'apparition récente dans la littérature des peptides élastiques, inspirés de la TE.

VIII. Les peptides élastiques

La stabilité structurale, la résilience élastique et la bioactivité de la TE, combinées à sa capacité d'auto-assemblage, en font un candidat prometteur pour la fabrication de biomatériaux. De plus, sa présence dans un grand nombre de tissus accompagnée d'un remplacement inefficace lors de la cicatrisation, impliquent la nécessité de développer des biomatériaux à base d'élastine.

De tels biomatériaux peuvent non seulement mimer les propriétés physiques de la MEC, mais possèdent également des fonctions biologiques permettant l'incorporation cellulaire et l'induction de voies de signalisation entraînant un remodelage matriciel dans les applications d'ingénierie (Yeo, Aghaei-Ghareh-Bolagh *et al.* 2015). Par ailleurs, la capacité à condenser les propriétés structurales, biologiques et d'auto-assemblage de la TE au sein de courts peptides, synthétisés chimiquement, a permis le développement de biomatériaux à base de peptides élastiques (ELP pour *Elastin-like peptides*).

VIII.1. Avantages des peptides élastiques sur la tropoélastine humaine

Bien que la TE résolve un grand nombre de problèmes associés à l'élastine d'origine naturelle (hétérogénéité des fragments extraits, immunogénicité), elle est relativement coûteuse et difficile à produire en masse pour des applications biomédicales. De plus, la taille, la complexité structurale et la flexibilité inhérente de la TE ne permet pas de déterminer avec précision les processus physico-chimiques conduisant au développement de matériaux à base de TE (Yeo, Keeley *et al.* 2011). A l'inverse, cinq caractéristiques, détaillées par la suite, font des ELP des candidats prometteurs pour des applications biomédicales, en particulier dans les systèmes d'administration de médicaments et dans les technologies d'ingénierie tissulaire (**Figure 23**) (Ciofani, Genchi *et al.* 2014) :

- 1) Les ELP sont exprimés à partir d'un gène synthétique, fournissant un contrôle strict sur la séquence d'acides aminés et la masse moléculaire.
- 2) Les ELP sont facilement synthétisés dans un hôte hétérologue, le plus souvent à partir d'un vecteur recombinant procaryote (*Escherichia Coli*, *E. coli*) donnant des rendements élevés, très attrayants dans le cadre d'applications en ingénierie tissulaire.

3) Les ELP sont facilement purifiés par la méthode d'ITC, plus simple et moins coûteuse que la chromatographie sur colonne, pour une purification à grande échelle.

4) Les ELP sont d'excellents polymères biomimétiques et intelligents dans la mesure où ils sont capables de moduler voire améliorer les propriétés physico-chimiques, structurales et fonctionnelles de la protéine native.

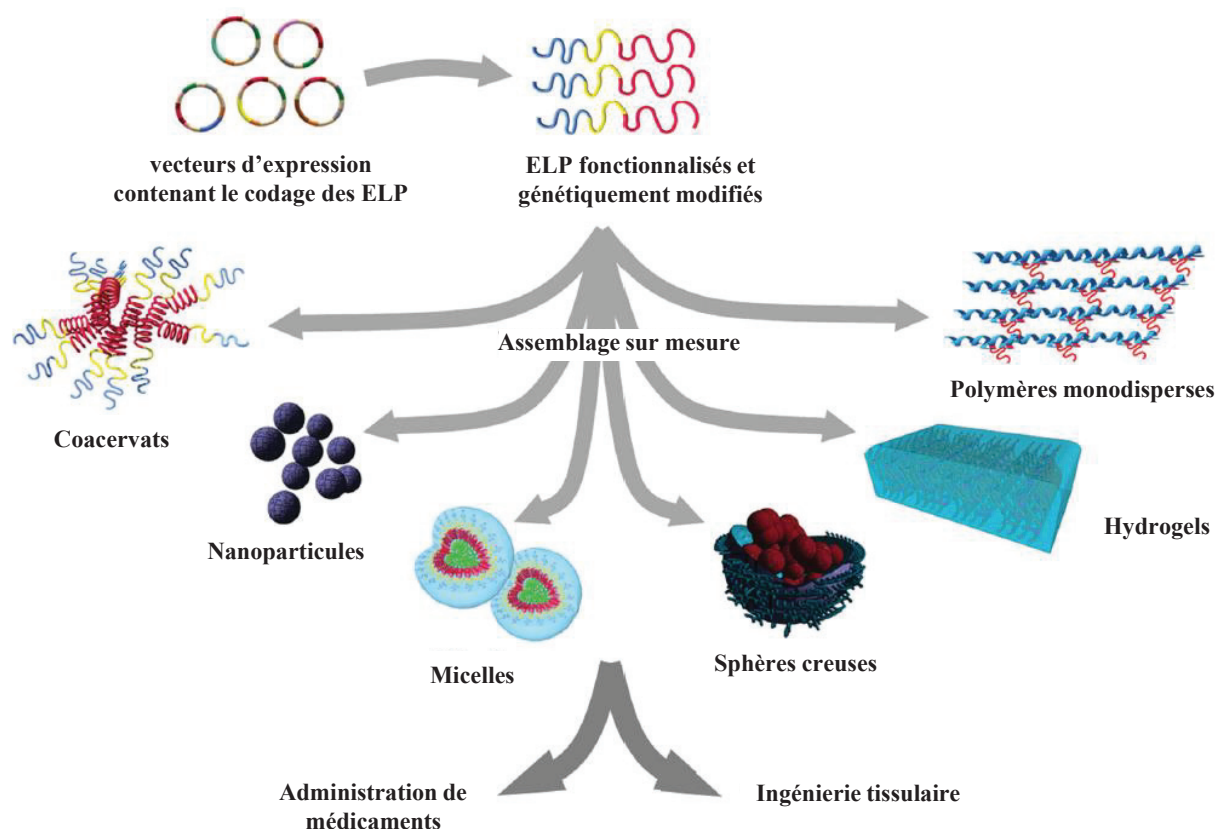


Figure 23 : Applications des ELP. Les techniques de génie génétique permettent de contrôler la séquence des ELP et, par conséquent, leurs propriétés physico-chimiques et biologiques dans le but de produire une gamme de biomatériaux à base d'ELP : coacervats, nanoparticules, micelles, sphères creuses et hydrogels. Ces biomatériaux ont diverses applications dans les systèmes d'administration de médicaments et dans les technologies d'ingénierie tissulaire (adaptée de Yeo, Aghaei-Ghareh-Bolagh *et al.* 2015).

VIII.1.1. Structure chimique

Les ELP sont des biopolymères artificiels généralement constitués du motif répété hydrophobe VPGXG, naturellement présent dans les domaines hydrophobes de la tropoélastine, où X représente tout acide aminé d'origine naturelle à l'exception de la proline (Trabbic-Carlson, Meyer *et al.* 2004). Cette séquence est dérivée du motif hydrophobe VPGVG, trouvé dans l'élastine de mammifère. Urry *et al.* ont mis en évidence la présence de motifs répétés dans les domaines hydrophobes de la protéine native. Ils ont démontré que la tropoélastine est caractérisée par des propriétés thermosensibles particulières en raison de ces motifs répétés (Rapaka and Urry 1978). Après analyse de la séquence de l'élastine bovine, ils ont identifié un domaine hydrophobe très régulier, codé par l'exon 18, contenant des blocs répétés de type VPGVG. Ils ont ainsi pu démontrer que les peptides synthétiques, portant de longues répétitions de ce motif, étaient doués de propriétés thermosensibles. D'autres motifs, dérivés des séquences hydrophobes de la tropoélastine, sont utilisés dans la conception des ELP : le nonapeptide LGAGGAGVL (Spezzacatena, Perri *et al.* 2002), l'hexapeptide LGAGGAG (Spezzacatena, Perri *et al.* 2002) et les pentapeptides KGGVG (Martino and Tamburro 2001), GVGVP (Swierczewska, Hajicharalambous *et al.* 2008) et VGGVG (Flamia, Zhdan *et al.* 2004). Un autre ELP, bien caractérisé, est constitué du motif répété VPVXG, dérivé de la tropoélastine bovine. Plus récemment, dans le but d'améliorer les propriétés du polypeptide, des peptides élastiques dérivés de la TE ont été synthétisés à partir du motif VAPGVG, le plus récurrent dans la protéine native (Ciofani, Genchi *et al.* 2013). Avec le développement, au cours de ces dernières années, des technologies de l'ADN recombinant (détaillées dans la partie suivante), J.C Rodríguez-Cabello a utilisé le terme d'*Elastin-like recombinamer* (ELR), plus spécifique et approprié pour désigner les peptides élastiques issus des systèmes d'expression hétérologues. Le terme « *recombinamer* » souligne la nature oligomérique et recombinante de ces macromolécules. Les ELR sont composés de la répétition du pentapeptide VPGXP, où X représente tout acide aminé naturel à l'exception de la proline (Rodríguez-Cabello, Martín *et al.* 2009).

VIII.1.2. Système d'expression hétérologue

La synthèse des ELP dans un hôte hétérologue, le plus souvent dans des cellules bactériennes ou eucaryotes, permet un contrôle précis de la séquence, la masse moléculaire et de la stéréochimie des peptides (Meyer and Chilkoti 2002) qui déterminent les propriétés physico-chimiques des constructions résultantes. Ces variables sont difficilement contrôlables dans les procédés de polymérisation chimiques.

La plupart des applications des ELP exigent de grandes quantités de polypeptides à haut degré de pureté et à un coût économique concurrentiel, qui peuvent être rendus possibles par des systèmes d'expression recombinants tels qu'*E. coli* (Rosano and Ceccarelli 2014). Le système d'expression *E. coli* offre des rendements relativement élevés pouvant atteindre 400 mg/L de culture pour des ELP libres ou des constructions chimériques (Chow, Dreher *et al.* 2006).

Néanmoins, l'obtention de tels rendements nécessite l'optimisation de nombreux facteurs, dont l'addition de proline et d'alanine exogènes, acides aminés abondants dans les ELP. De plus, les endotoxines, macromolécules de nature polysaccharidique situées dans la membrane externe des bactéries et susceptibles de déclencher des réactions inflammatoires, sont difficilement éliminées du produit ELP final.

C'est pourquoi un système d'expression alternatif fondé sur la souche de levure *Pichia pastoris* a été exploré (Sallach, Conticello *et al.* 2009). Les ELP sont sécrétés par des cellules de levure et sont purifiés directement à partir du milieu de culture. Les systèmes d'expression à base de levure s'adaptent également aux processus de fermentation à l'échelle industrielle. Cependant, les rendements obtenus à partir de ces systèmes (255 mg/L de culture) sont souvent inférieurs à ceux des systèmes bactériens.

Les systèmes à base de plantes sont de plus en plus reconnus comme étant un moyen efficace et peu coûteux de production d'ELP (Conley, Joensuu *et al.* 2009). Néanmoins, ce système d'expression n'a pas encore été optimisé pour un rendement maximal et une purification efficace.

VIII.1.3. Purification par ITC

La chromatographie sur colonne est une méthode standard pour la purification d'ELP, cependant des alternatives moins coûteuses ont été explorées. La méthode « *Inverse Transition Cycling* » (ITC) exploite la température de transition inverse et réversible, spécifique aux ELP (**Figure 24**) (Hassouneh, Christensen *et al.* 2010) (Meyer and Chilkoti 1999).

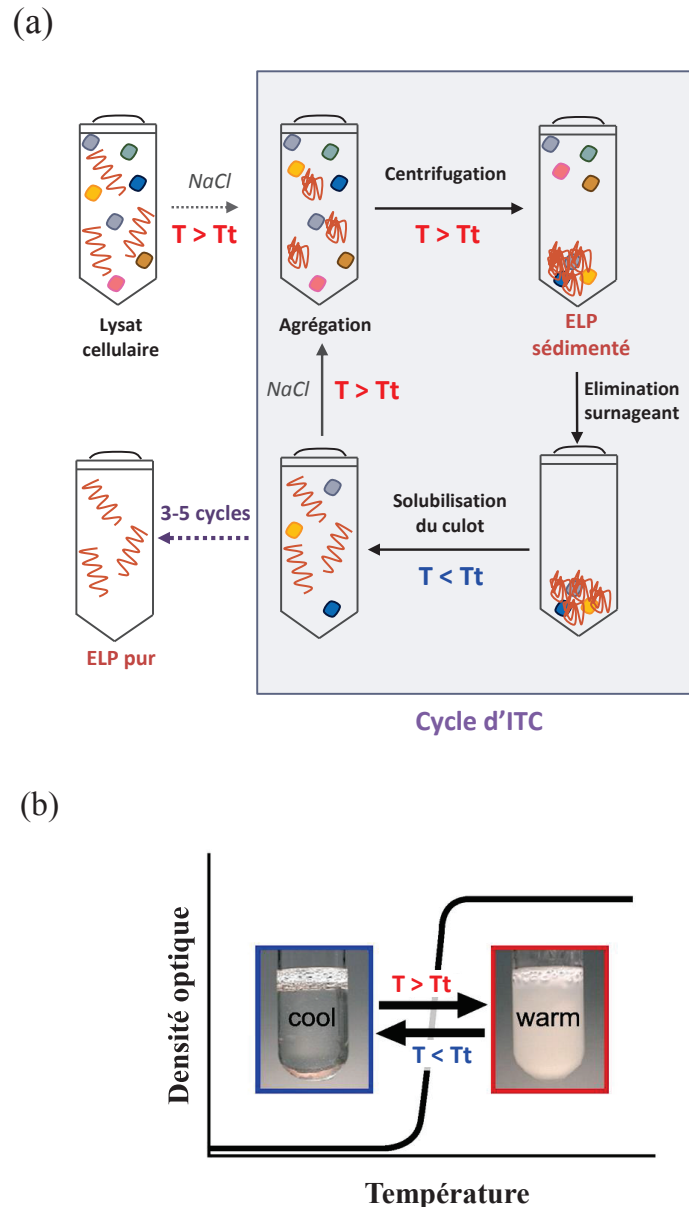


Figure 24: Purification des ELP par la technique d'ITC (Inverse Transition Cycling)

grâce à leur capacité intrinsèque de coacervation. A) L'ITC implique plusieurs cycles d'étapes successives, qui incluent le chauffage, la centrifugation, le refroidissement et la solubilisation. L'augmentation de la température de la solution d'ELP non purifiée ($T > T_t$) entraîne l'agrégation des ELP, qui forment des coacervats. L'étape de centrifugation permet ensuite de séparer le culot, formé d'ELP coacervés, du surnageant, qui contient des contaminants solubles et autres composés. La solubilisation du culot dans un environnement plus froid ($T < T_t$) suivie de la répétition de plusieurs cycles de chauffage et centrifugation, génèrent la purification optimale des ELP (Hassouneh, Christensen *et al.* 2010). B) Coacervation *in vitro* des ELP. Les ELP subissent une transition de phase inverse de température réversible. Une augmentation de la température, au-dessus de la température de transition ($T > T_t$), induit l'auto-assemblage hydrophobe des molécules ELP pour former un coacervat hautement visqueux, qui se solubilise en-dessous de la T_t ($T < T_t$) (MacEwan and Chilkoti 2014).

Cette technique implique généralement plusieurs cycles d'étapes successives qui incluent le chauffage, la centrifugation, le refroidissement et la solubilisation. L'augmentation de la température de la solution d'ELP non purifiée entraîne l'agrégation des ELP, qui forment des coacervats. L'étape de centrifugation permet ensuite de séparer le culot formé d'ELP coacervés, du surnageant qui contient des contaminants solubles et d'autres composés. La solubilisation du culot dans un environnement plus froid suivie de la répétition de plusieurs cycles de chauffage et centrifugation, génèrent la purification optimale des ELP. Cette propriété de coacervation, propre à chaque ELP, est conservée même après le greffage d'un ELP à un autre polypeptide ou composant protéique, permettant la purification d'une gamme diversifiée de protéines de fusion.

VIII.1.4. Les peptides élastiques, des polymères biomimétiques intelligents

Les peptides élastiques (ELP pour *Elastin-like peptide*) sont d'excellents exemples de polymères biomimétiques récemment proposés dans la recherche biomédicale dans le but de comprendre et d'exploiter les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la tropoélastine humaine. L'ajustement précis de la structure primaire des ELP peut moduler voire améliorer les propriétés physico-chimiques, structurales et fonctionnelles de la protéine native. De plus, la capacité des ELP à ajuster leurs caractéristiques physico-chimiques en réponse à des stimuli externes (température, pH), les définis comme des polymères intelligents (Meyer and Chilkoti 2002).

VIII.1.4.1. Propriétés d'auto-assemblage et réactivité aux stimuli externes

Les ELP sont sensibles à la chaleur et subissent une transition de phase inverse de température réversible (**Figure 24**) (Reguera, Urry *et al.* 2007). Une augmentation de la température au-dessus de la température de transition (T_t) induit l'auto-assemblage hydrophobe des molécules ELP pour former un coacervat hautement visqueux. En-dessous de la T_t , les chaînes du polymère sont hydratées par des clathrates d'eau qui solubilisent l'ELP. En revanche, au-dessus de la T_t , les clathrates d'eau se désorganisent et se rompent de façon similaire à la TE.

Comme pour la TE, la température de transition des ELP est affectée par la séquence, la masse et la concentration du polypeptide ainsi que par la force ionique et le pH de la solution, permettant de moduler et contrôler le processus d'assemblage (Meyer and Chilkoti 2004). Les acides aminés apolaires augmentent l'hydrophobicité globale du polypeptide et par conséquent, diminuent, la Tt. A l'inverse, les acides aminés polaires augmentent la Tt. La corrélation entre la Tt et la polarité des ELP a été démontrée par la différence de comportement de la transition de phase de l'ELP $[V_8]_2$ en remplaçant la valine par divers résidus. L'augmentation de l'hydrophobicité de l'ELP $[V_8]_2$, en remplaçant Val par Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp diminue la Tt. En revanche, la diminution de l'hydrophobicité de l'ELP en substituant Val par Gln, Asn, Ser, Thr, Gly ou Ala augmente la Tt (Urry, Gowda *et al.* 1992). La proline n'est pas utilisée comme résidu de substitution car elle perturbe la conformation de la molécule, ce qui entrave les processus de coacervation et de repliement.

La présence de résidus de lysine dans la séquence des ELP leur confère une caractéristique amphiphile, leur permettant de former des structures en forme de micelles stables (Dreher, Simnick *et al.* 2008).

Des études ont révélé que l'augmentation de la masse moléculaire des ELP, sans modifier leur hydrophatie globale, réduit considérablement la Tt. De plus, les résidus d'acides aminés constitués de groupements sensibles à l'ionisation, sont capables de réguler la Tt en variant le pH de la solution (Miao, Bellingham *et al.* 2003).

VIII.1.4.2. Propriétés biophysiques

Les propriétés biophysiques des ELP, qui leur confèrent un comportement unique, sont semblables aux propriétés de nombreuses protéines intrinsèquement désordonnées (IDP pour *Intrinsically Disordered Proteins*). Urry et collaborateurs sont les premiers à avoir démontré que les peptides élastiques n'adoptaient pas une conformation aléatoire mais plutôt en coudes- β , composés d'unités de répétition PG, conférant une conformation en spirales- β étendue et ordonnée (Urry, Hugel *et al.* 2002). Les travaux de Tamburro et collaborateurs suggèrent également la présence de coudes- β de type II (Debelle and Tamburro 1999). Néanmoins, ce modèle prédit des coudes- β dynamiques et non-récurrents, qui s'interconvertissent en un état désordonné ou un état constitué de liaisons hydrogènes. Les premiers travaux dans ce domaine ont été en proie à de nombreux problèmes auxquels sont aujourd'hui confrontés les IDP.

L'incapacité à utiliser la cristallographie aux rayons X pour générer des structures de protéines à haute résolution, a conduit au développement de méthodes plus indirectes pour évaluer les ELP. Les spectres de dichroïsme circulaire des ELP, proposés par Martino et collaborateurs, révèlent la présence de coudes- β et de structure de type polyproline II (PPII) (Martino, Bavoso *et al.* 1998). Pour mettre fin à la confusion qui règne concernant la « vraie » structure des ELP, des chercheurs ont effectué des simulations de dynamiques moléculaires, qui fournissent une résolution atomistique de la conformation des ELP et constituent un outil fonctionnel pour l'analyse du désordre. Les résultats de simulations de Darwin, Rauscher et leurs collaborateurs suggèrent que les ELP sont principalement des polymères hélicoïdaux aléatoires dans lesquels chaque répétition est capable d'adopter, indépendamment et de façon transitoire, une conformation en coude- β et en hélice de type PPII. La capacité des ELP à adopter des conformations ordonnées de façon transitoire est une caractéristique importante partagée par beaucoup d'IDP (Li, Alonso *et al.* 2001) (Rauscher, Neale *et al.* 2009).

Cette conformation structurée des ELP est possible jusqu'à ce qu'une force motrice thermodynamique induise un changement, comme la température par exemple. A l'inverse, pour la plupart des IDP, la force motrice thermodynamique qui déclenche leur changement conformationnel est l'interaction avec un autre partenaire (van der Lee, Buljan *et al.* 2014).

Les ELP doivent leur nature désordonnée intrinsèque aux résidus de proline et de glycine, mais pour des raisons opposées. En effet, la glycine favorise la mobilité de la chaîne ELP, lui permettant d'adopter diverses conformations. En revanche, la proline favorise la rigidité sur toutes les échelles de longueur de l'ELP, empêchant la formation de structures secondaires stables. Une fois combinés, ces deux résidus travaillent ensemble pour garder les ELP à des degrés de désordre différents, à la fois dans un état solvato et dans un état agrégé.

VIII.1.4.3. Biocompatibilité

La biocompatibilité des ELP peut être améliorée par l'incorporation de séquences bioactives qui favorisent l'adhérence et la prolifération cellulaire (Garcia-Arevalo, Pierna *et al.* 2012). Par exemple, les ELP conçus avec la séquence de reconnaissance de l'intégrine « Arg-Gly-Asp » (RGD) sont capables de limiter l'adsorption non spécifique des protéines.

En conséquence, les surfaces de polymères fonctionnalisées avec ces ELP bioactifs révèlent une augmentation de la fixation, de l'étalement, de l'adhérence et de la prolifération cellulaire comparées aux surfaces fonctionnalisées avec des ELP quelconques (Punet, Mauchauffé *et al.* 2013). Cette capacité encourage l'utilisation des ELP dans la fonctionnalisation des surfaces 2D pour favoriser les réponses cellulaires. Des ELR ont également été conçus avec deux séquences bioactives, RGD et REDV (Arg-Glu-Asp-Val), la dernière favorisant la reconnaissance des cellules endothéliales. Ces ELR ont permis la création d'hydrogels bioactifs utilisés dans le cadre de l'ingénierie vasculaire pour recouvrir des stents (**Figure 25**). La présence de ces séquences bioactives au sein de l'ELR a permis une endothélialisation complète des stents en moins de deux semaines *in vitro* au lieu de quatre à six semaines pour des stents nus (de Torre, Wolf *et al.* 2015).

Ces différentes études renforcent ainsi notre capacité à prédire le comportement des ELP dans des microenvironnements physiologiques variés, ce qui est essentiel pour concevoir des molécules synthétiques et bioactives à visée thérapeutique ou dans le cadre de biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire.



Figure 25: Stent recouvert d'un hydrogel ELR bioactif pour l'ingénierie vasculaire. Les ELR contenus dans l'hydrogel ont été fonctionnalisés avec les séquences bioactives RGD et REVD connues respectivement pour être des séquences de reconnaissance des intégrines $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1/\beta_3/\beta_5/\beta_6/\beta_8$ et $\alpha_8\beta_1$ et des cellules endothéliales (de Torre, Wolf *et al.* 2015).

VIII.2. Les hydrogels ELP

Les propriétés des ELP sont très prometteuses pour la fabrication de divers matériaux tels que les hydrogels, les films et les fibres. Les hydrogels ELP, en particulier, ont beaucoup attiré l'attention au cours de ces dix dernières années en raison de leurs applications dans l'administration de médicaments et en ingénierie tissulaire (van Eldijk, McGann *et al.* 2012).

VIII.2.1. Synthèse

Les hydrogels ELP peuvent être synthétisés par polymérisation de monomères en l'absence de liaisons covalentes. Cette méthode est illustrée par l'agrégation hydrophobe de copolymères ELP tri-blocs, composés d'une région centrale hydrophile entourée, aux deux extrémités, de résidus hydrophobes (Wu, Sallach *et al.* 2005). Les domaines hydrophobes s'agrègent à une température supérieure de la température de transition (T_t) de l'ELP, créant un hydrogel pouvant être stabilisé par des réticulations physiques.

Un autre procédé de polymérisation implique la sonication de monomères d'ELP pour produire un hydrogel par enchevêtrement physique des chaînes carbonées. Cette technique permet l'encapsulation et la préservation de molécules bioactives au sein de la structure de l'hydrogel (Amruthwar and Janorkar 2012). En effet, des hydrogels ELP, emprisonnant des médicaments, ont été formés par sonication d'une solution $(VGVPG)_{120}$ en-dessous de la T_t , suivie de l'addition de molécules médicamenteuses et la gélification au-dessus de la T_t .

La réticulation physique présente l'avantage d'être non toxique par rapport à la réticulation chimique. En revanche, ces hydrogels ont des propriétés mécaniques difficilement modulables et ne sont pas assez rigides pour être utilisés en ingénierie tissulaire.

Ainsi, la rigidité et la cohésion des hydrogels ELP peuvent être augmentées par des réticulations chimiques générant des liaisons covalentes entre les fragments ELP. Les hydrogels peuvent être réticulés par irradiation- γ , les transglutaminases, la lumière UV et des agents réticulants chimiques tels que BS3 (*disuccinimidyl suberate*), THPP (β -[tris(hydroxymethyl)phosphino]-propionic acid) ou encore la génipine (Hrabchak, Rouleau *et al.* 2010; Yeo, Aghaei-Gharch-Bolagh *et al.* 2015).

VIII.2.2. Propriétés

Comme les monomères ELP, l'hydrogel ELP est sensible à la chaleur. En effet, il présente une T_t qui peut varier en fonction de la composition en acides aminés des ELP qui le composent, mais également en fonction du pH et de la concentration en sel. La corrélation entre la température de fabrication de l'hydrogel ELP et la T_t influe considérablement sur les propriétés structurales du matériau. Les hydrogels réticulés dévoilent une opalescence significative, qui représente une séparation de phase des fragments hydrophobes et hydrophiles du matériau. Pour étudier ces réarrangements structuraux qui accompagnent cette transition de phase, les hydrogels ELP ont été analysés par microscopie électronique (Du, Zhou *et al.* 2013). En-dessous de la T_t , les gels montrent un réseau constitué de chaînes pontées de manière aléatoire, alors qu'au-dessus de la T_t , des filaments perlés sont observés. Ces filaments s'agrègent en faisceaux ressemblant étroitement à la fibre élastique native. Les hydrogels ELP présentent une rigidité dépendante de la T_t , variant de 0,24-3,7 kPa à 7°C à 1,6-15 kPa à 37°C, et de la séquence primaire des ELP (Urry, Luan *et al.* 1997). Aux basses températures, les gels sont presque parfaitement élastiques, tandis qu'aux températures plus élevées ($T > T_t$), les gels perdent de l'eau, ce qui augmente leur viscosité (**Figure 26**).

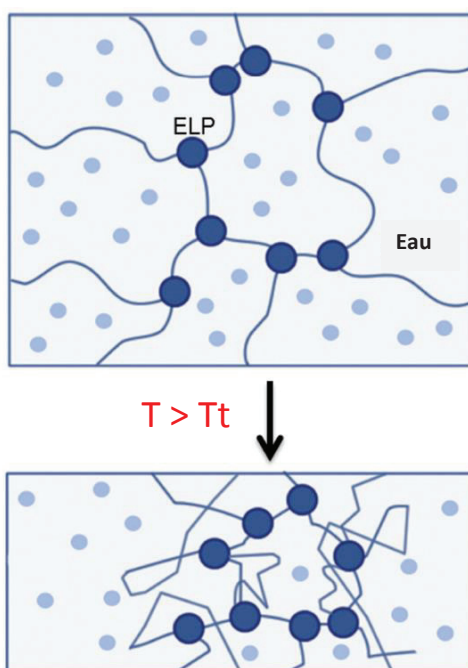


Figure 26: Schéma de principe de la perte d'eau provenant de la contraction de l'hydrogel ELP, suite à l'augmentation de la température. En-dessous de la température de transition (T_t), les monomères ELP sont étendus et entourés de molécules d'eau. Au-dessus de la T_t ($T > T_t$), l'hydrogel se contracte, entraînant les molécules d'eau à l'extérieur de la structure (adaptée de Yeo, Aghaei-Ghareh-Bolagh *et al.* 2015).

VIII.3. Applications des ELP

VIII.3.1. Administration de médicaments

VIII.3.1. 1. Administration locale de médicaments

Les médicaments, composés de petites molécules, injectés dans le corps humain se dispersent rapidement et sont vite éliminés par les reins, fournissant une valeur thérapeutique minimal (Ruiz-Garcia, Bermejo *et al.* 2008). Par conséquent, de nombreux médicaments qui ont dévoilé de grandes promesses *in vitro*, ont perdu de leur efficacité *in vivo*. Pour augmenter la concentration du médicament dans le tissu cible, de nouvelles stratégies d'administration de médicaments ont été développées dans le but d'augmenter le temps de circulation du médicament, diminuer sa dégradation et cibler des récepteurs cellulaires spécifiques ou des sites intracellulaires (Torchilin and Lukyanov 2003). Ces nouveaux systèmes d'administration de médicaments doivent maintenir une forte concentration de médicaments avec une libération contrôlée, et résister à la filtration et à la dégradation réticulo-endothéliale.

Les coacervats d'ELP répondent à ces critères. En effet, ces structures présentent une faible viscosité au moment de l'administration et peuvent polymériser quelques minutes après l'injection, formant dans certains cas un hydrogel (Xu, Asai *et al.* 2012). De plus, les coacervats ne sont pas cytotoxiques, de même que leurs produits de dégradation (Shah, Hsueh *et al.* 2012). Ils sont biocompatibles, biodégradables, non immunogéniques et sont en mesure de conserver les propriétés mécaniques de la protéine native. De manière importante, la température de transition inverse (Tt) des ELP permet l'encapsulation de médicaments au sein du coacervat. Les coacervats d'ELP sont capables de maintenir leur intégrité structurale lorsqu'ils sont injectés dans les parties du corps avec un faible écoulement de fluide, comme les espaces intra-articulaires et les articulations synoviales (Betre, Ong *et al.* 2006). Etant donné la dissipation lente des coacervats d'ELP, les médicaments piégés au sein de ces structures sont libérés sur une longue période, entraînant une accumulation accrue de médicaments dans les tissus cibles. La dégradation enzymatique de ces structures, pour la libération de médicaments, a lieu préférentiellement dans les régions ayant une activité accrue d'élastase, souvent corrélée avec des conditions pathologiques telles que l'emphysème pulmonaire, l'athérosclérose, l'inflammation ou dans le cas des plaies chroniques (Bieth 2001). Par exemple, il a été démontré qu'un hydrogel ELP stable améliore la libération de

médicaments lorsqu'il est exposé à une activité élastolytique. Par ailleurs, il a été démontré que la réticulation des ELP améliore la stabilité du coacervat (Adams, Shamji *et al.* 2009).

VIII.3.1. 1. Administration systémiques de médicaments

Les micro/nanoparticules d'ELP ont été développées dans les circonstances où l'administration locale de médicaments n'est pas possible par injection ou implantation (Bessa, Machado *et al.* 2010). Ces particules se composent soit de polymères d'ELP simples ou de copolymères di-blocs et tri-blocs, et peuvent se refermer ou être conjuguées à des molécules médicamenteuses. Il a été démontré que les ELP, de structure (VPAVG)₂₂₀, sont capables de s'auto-assembler en particules plus ou moins sphériques d'environ 250 nm de diamètre (Bessa, Machado *et al.* 2010). Ces particules peuvent encapsuler les facteurs de croissance BMP (*Bone morphogenic proteins*), préalablement mélangés avec la solution d'ELP. Les tests *in vitro* ont montré une libération contrôlée des BMP sur plusieurs jours, assurant ainsi le maintien de l'activité ostéoinductive. Ces nanostructures sont également fabriquées par la technique d'électrospraying, où les ELP sont préalablement mélangés avec un agent chimio-thérapeutique hydrophobe, la doxorubicine, dans une solution aqueuse, puis pulvérisés, sous l'action d'un champ électrique, afin de produire des nanoparticules sphériques encapsulant le médicament (**Figure 27**) (Wu, MacKay *et al.* 2009).

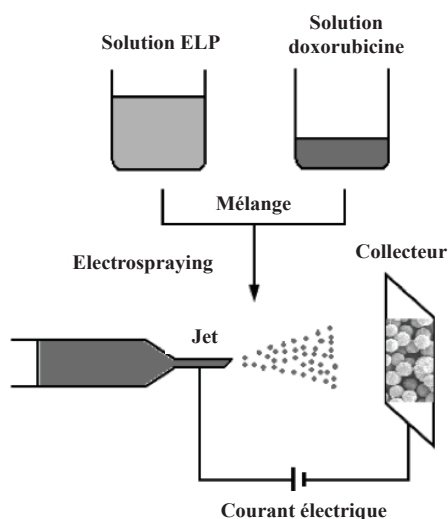


Figure 27: Représentation schématique de la technique d'électrospray pour la préparation de nanoparticules d'ELP sphériques encapsulant de la doxorubicine.

Les ELP sont préalablement mélangés avec un agent chimio-thérapeutique hydrophobe, la doxorubicine, dans une solution aqueuse, puis pulvérisés, sous l'action d'un champ électrique, afin de produire des nanoparticules sphériques encapsulant le médicament (adaptée de Wu, MacKay *et al.* 2009).

Pour augmenter la stabilité de ces systèmes d'administration, des micelles, constituées de copolymères ELP di-blocs et tri-blocs, ont été développées (**Figure 28**) (Kim, Thevenot *et al.* 2010). Ces copolymères présentent une partie hydrophobe et une autre, hydrophile. La taille de ces micelles varie en fonction de la température de transition (T_t) des ELP, et peut atteindre entre 90 et 120 nm de diamètre. En effet, en-dessous de la T_t , les ELP sont solubles alors qu'au-dessus de la T_t , les ELP coacervent et s'organisent en micelles avec un noyau hydrophobe et une couronne hydrophile, exposée au solvant. Ces micelles sont plus stables que de simples coacervats grâce à la formation de ponts disulfures entre les résidus de cystéines libres. De plus, les micelles sont capables de transporter des médicaments hydrophobes à travers le système circulatoire.

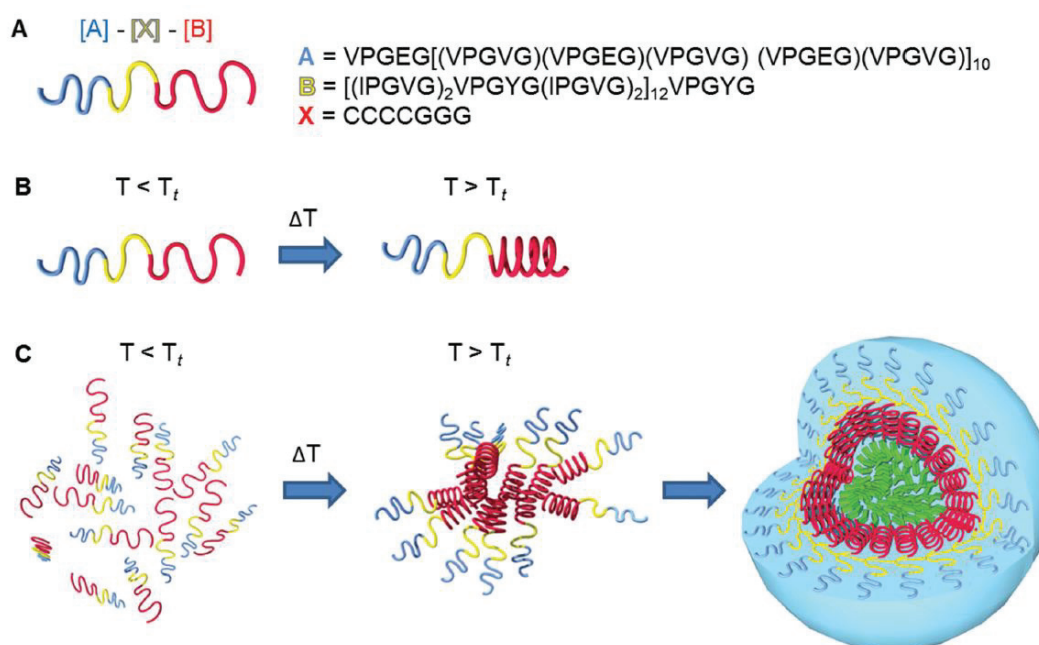


Figure 28: Formation de structures micellaires ELP. A) Schéma d'un ELP di-blocs amphiphile constitué d'une région hydrophile (en bleu) et d'une région hydrophobe (en rouge) avec au centre une région riche en résidus de cystéine (en jaune). B) Changement structural des ELP au cours de l'auto-assemblage, caractérisé par un repliement des domaines hydrophobes en spirales- β au-dessus de la T_t . C) En-dessous de la T_t , les ELP dépliés sont solubles. Une fois la T_t atteinte, les ELP s'agrègent et forment des micelles. Ces micelles sont stabilisées par des ponts disulfures formés entre les résidus de cystéine (en jaune). Les micelles peuvent piéger des molécules médicamenteuses hydrophobes au sein de leur cœur apolaire (Yeo, Aghaei-Ghareh-Bolagh *et al.* 2015).

VIII.3.2. Ingénierie tissulaire

Des matrices 3D à base d'ELP, formées par coacervation, réticulation physique ou chimique de solution d'ELP, ont été développées pour la réparation et la régénération des tissus durs et mous, soulignant le caractère plurifonctionnel des ELP.

Ingénierie tissulaire osseuse

Les ELP, qui se solidifient rapidement à la température du corps, ont été étudiés comme candidats potentiels pour la réparation et la régénération osseuse. Des matrices 3D à base d'ELP ont été conçues en incorporant des motifs de signalisation qui activent la croissance des cellules osseuses et guident le dépôt d'hydroxyapatite, principal composant minéral de l'os, chez le rat (Tejeda-Montes, Klymov *et al.* 2014).

Ingénierie tissulaire du cartilage

Des coacervats ELP, avec des chondrocytes piégés au sein de la structure, ont été utilisés pour réparer le cartilage articulaire, qui n'a pas la capacité de se régénérer naturellement. Après injection intra-articulaire, ces structures peuvent induire la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes, même en l'absence de facteurs de croissance chondrocytaires (Betre, Ong *et al.* 2006).

Ingénierie tissulaire vasculaire

Les greffes de petits vaisseaux échouent fréquemment en raison de l'apparition de sténoses et thromboses, provoquées par la prolifération des myofibroblastes. L'échec de la greffe est aussi attribué à un décalage mécanique avec le vaisseau natif et la croissance insuffisante des cellules endothéliales. Pour résoudre ces problèmes, des matrices 3D à base d'ELP peuvent être ajustées pour correspondre au tissu natif, en les conjuguant avec des peptides de signalisation cellulaire pour des applications vasculaires. Par exemple, un matériau constitué de monomères ELP, chacun conjugué avec une séquence de liaison cellulaire dérivée de la fibronectine (GRGDSP), favorise l'angiogenèse et la formation d'une MEC avec une distribution normale de collagène et d'élastine. Mécaniquement, ces constructions ELP ont des caractéristiques de résistance à la traction similaire à l'élastine native (Di Zio and Tirrell 2003).

Ingénierie tissulaire neural

Les tissus neuraux possèdent une capacité de régénération limitée et sont donc rarement en mesure de combler les défauts causés par les blessures ou les maladies du système nerveux. Des constructions ELP ont été développées pour leur capacité à guider l'extension des neurites. Par exemple, des hydrogels ELP, contenant la séquence signal d'adhérence cellulaire RGDS et, réticulés avec du THPC (*chlorure de tétrakis(hydroxyméthyl)phosphonium*), ont été fabriqués pour l'excroissance des dendrites et axones. Ces matériaux présentent un module d'élasticité de 0,5-2,1 kPa, en accord avec la faible rigidité des tissus mous (Lampe, Antaris *et al.* 2013). Des conduits tubulaires concentriques, recouverts à l'intérieur et à l'extérieur de couches de gel ELP, ont révélés une biocompatibilité *in vitro* et une augmentation de plus de 1 mm de la croissance des neurites des cellules ganglionnaires de la racine dorsale transplantée.

Les ELP peuvent être conjugués à d'autres peptides, protéines, polysaccharides ou polymères chimiques, dans le but de développer des architectures plus complexes ou d'augmenter les propriétés mécaniques et fonctionnelles des matériaux existants, comme il en a été question dans la dernière partie de ma thèse où des résultats préliminaires sur un hydrogel composite seront présentés.

BUT DU TRAVAIL

But du travail

Les peptides élastiques (ELP pour *Elastin-like peptide*) sont d'excellents exemples de polymères biomimétiques récemment proposés dans la recherche biomédicale dans le but de comprendre et d'exploiter les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la tropoélastine humaine (TE). L'ajustement précis de la structure primaire des ELP peut moduler voire améliorer les propriétés physico-chimiques, structurales et fonctionnelles de la protéine native. De plus, la capacité des ELP à ajuster leurs caractéristiques physico-chimiques en réponse à des stimuli externes (température, pH), les définit comme des polymères intelligents. Ces polymères bioactifs offrent ainsi une large gamme d'applications très prometteuses encore très peu explorées dans les technologies d'ingénierie tissulaire et les systèmes d'administration de médicaments. Les ELP connus à ce jour sont essentiellement des peptides chimériques au sein desquels des séquences bioactives exogènes, spécifiques d'autres protéines matricielles, ont été ajoutées afin d'améliorer leurs fonctions biologiques. Ces peptides chimériques présentent des propriétés supplémentaires à celles de la TE, les éloignant ainsi de la fonction native de la protéine.

C'est la raison pour laquelle dans ce travail de thèse, nous avons développé, caractérisé et évalué les potentiels thérapeutiques d'une protéine élastique biomimétique, nommée Elactiv', avec une structure moins complexe que les ELP décrits dans la littérature dans le but de mimer le plus justement possible les propriétés de la TE et de répondre à un besoin de standardisation des propriétés élastiques dans des modèles d'ingénierie tissulaire. Pour cela, nous nous sommes inspirés des propriétés uniques de la TE inhérentes à son comportement mécanique élastique intrinsèque, tout en essayant de soustraire les paramètres indésirables de cette protéine et notamment son caractère pro-inflammatoire dû à une multitude de peptides bioactifs libérés suite à sa dégradation et l'hétérogénéité de ses isoformes qui sont tissus spécifiques (Heim, Pierce et al. 1991).

Ce travail de thèse s'inscrit dans le projet ANR DHERMIC (ANR-11-TECS-016) « Dendrigraft Hybride Élastique pour la Régénération et la Modélisation en Ingénierie Cutanée », en collaboration avec l'Ecole Centrale de Lyon (Ecully) et l'entreprise COLCOM (Clapiers) qui sont respectivement reconnues pour leur expertise sur la biomécanique de la peau et leur savoir-faire sur la chimie des dendrigrafts de lysine, utilisés dans ce travail de thèse.

Dans une première partie, nos objectifs ont été de concevoir, synthétiser et caractériser la protéine Elactiv'. Ainsi, nous avons pu déterminer ses propriétés physico-chimiques (structures secondaires, comportement thermosensible, capacité de coacervation, propriétés d'auto-assemblage), et ses fonctions biologiques (prolifération, différenciation, survie et morphologie cellulaire, sensibilité à la dégradation enzymatique, capacité d'incorporation dans les fibres élastiques néo-synthétisées) après avoir été mise en contact avec des fibroblastes dermiques et des kératinocytes primaires humains.

Dans une deuxième partie, notre objectif a été d'utiliser la protéine Elactiv' comme un outil potentiel thérapeutique dans un modèle d'élastogenèse imparfaite : le syndrome de Williams-Beuren (WB). En raison de la synthèse quasi-inexistante de fibres élastiques par les fibroblastes dermiques des patients WB, nous avons voulu savoir si la protéine Elactiv' était capable de compenser ou réinduire *in vitro* la synthèse de tropoélastine fibrillaire par les cellules de ces patients.

Dans une troisième partie, notre objectif a été de développer un hydrogel, composé exclusivement de la protéine Elactiv', dans le but d'accéder d'une part, aux propriétés mécaniques de l'ensemble par des essais d'indentation grâce au micro-indenteur développé à l'Ecole Centrale de Lyon ; et d'autre part, nous avons pu analyser sa toxicité cellulaire et sa résorption *in vivo* en implantant l'hydrogel en sous-cutané chez la souris.

Dans une quatrième partie, notre objectif a été de greffer la protéine Elactiv' à un polymère synthétique hautement fonctionnalisable, le dendrigraft de poly(L-lysine) (DGL) développé par l'entreprise COLCOM, dans le but d'orienter la protéine et ainsi augmenter ses fonctions biologiques dans des cultures en deux dimensions. Les DGL n'ayant jamais été utilisé en tant que support de culture *in vitro*, nous avons vérifié le comportement des fibroblastes dermiques et kératinocytes primaires humains vis-à-vis de ce substrat.

Dans une dernière partie, notre objectif a été de développer un hydrogel composite dans lequel la protéine Elactiv' a été associée aux DGL, permettant de faire évoluer l'architecture du matériau et d'augmenter ses propriétés mécaniques et biologiques. A ce jour, seule la preuve de concept a pu être validée.

MATERIELS & METHODES

I. Synthèse de la protéine élastique Elactiv'

I.1. Clonage du gène Elactiv'

I.1.1. Vecteurs et souches bactériennes

I.1.1.1. Vecteurs utilisés pour le clonage

Vecteur pUC57-Elactiv'

La synthèse du gène, codant pour Elactiv', a été externalisée vers la société GenScript (Piscataway, USA). La séquence d'ADN, de 1794 pb, a été définie pour une expression optimale en système procaryote *Escherichia coli* (*E. coli*), dans le but d'éliminer les codons rares grâce à l'algorithme « OptimumGeneTM », et insérée dans le vecteur à haut taux de réplication pUC57, au niveau du site de restriction *EcoRV* (**Figure 29**). Par ailleurs, trois bases ont été ajoutées à l'extrémité 5' de la séquence nucléotidique créant l'espacement nécessaire entre la séquence rbs et le codon d'initiation de la traduction, assurant ainsi la synthèse de la protéine Elactiv'. D'autre part, neuf bases de protection ont également été ajoutées au niveau de l'extrémité 3' de la séquence d'ADN.

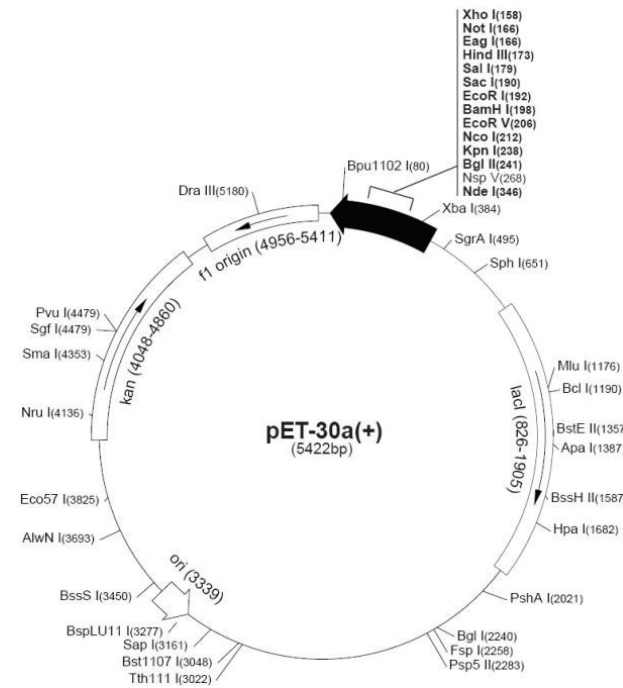
Vecteur d'expression procaryote pET30A

Le plasmide pET30a (Merck Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) a été utilisé pour l'expression du gène *Elactiv'* (**Figure 30**).



113

(A)



(B)

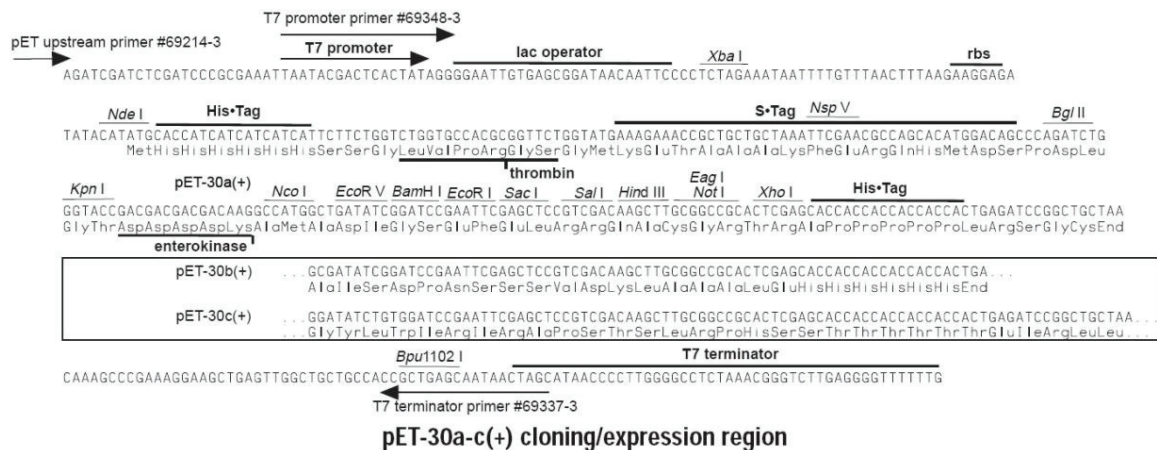


Figure 30: Structure du vecteur pET30a (figure tirée du site web de Merck Millipore, <http://www.merckmillipore.com>). (A) La carte de restriction du vecteur pET30a présente les sites de restriction uniques, l'orientation et l'emplacement de l'origine de réplication procaryote (ori), de l'origine de réplication du phage f1 (florigin), du gène du répresseur lacI, du gène de résistance à l'antibiotique kanamycine (kan) et du site multiple de clonage (flèche noire pleine). (B) Séquence nucléotidique et peptidique du site multiple de clonage. Les flèches montrent l'emplacement du promoteur et de la région de terminaison de l'ARN polymérase du phage T7 ; les traits fins indiquent les sites de restriction et les traits en gras indiquent les séquences nécessaires à l'expression. Les séquences codantes pour le His-Tag, le S-Tag ainsi que les sites de reconnaissance de l'entérokinase et de la thrombine, sont aussi représentés par des traits en gras.

I.1.1.2. Souches bactériennes

Plusieurs souches d'*E. coli* ont été utilisées :

- La souche **JM109** (Promega, Charbonnières, France) a été utilisée pour le clonage du gène *Elactiv'* dans le plasmide d'expression pET30a. Cette souche offre un taux de transformation élevé.
- La souche **BL21 (DE3)** (Life technologies, Saint-Aubin, France) a été utilisée pour la surexpression du gène *Elactiv'*, sous le contrôle du promoteur T7 et inductible à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Cette souche porte une mutation dans les gènes de protéases *lon* et *ompT*, ce qui permet la production de peptides stables.

I.1.1.3. Milieux et conditions de culture

Les bactéries ont été cultivées à 37°C soit en milieu liquide sous agitation (220 rpm) soit sur gélose. Le milieu de culture est du Luria Bertani (LB) Broth (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), composé de 10g/L de bactotrypone, 5g/L d'extrait de levure, 5g/L de NaCl pH 7, complété par un antibiotique de sélection choisi en fonction du plasmide intégré par la bactérie. Dans cette étude, la kanamycine (Sigma-Aldrich) a été utilisée à 50 μ g/ml.

I.1.2. Amplification et extraction du vecteur pUC57-Elactiv'

Au cours de cette étape, le vecteur recombinant pUC57-*Elactiv'* a été utilisé pour transformer les bactéries compétentes *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109. Une fois transformées, les bactéries ont été amplifiées puis sélectionnées sur un milieu sélectif solide LB-Agar + kanamycine, dans le but d'extraire l'ADN plasmidique (pUC57-*Elactiv'*) en grande quantité.

I.1.2.1. Minipréparation

Les colonies bactériennes (JM109) transformées, ont été prélevées sur une boîte de gélose, transférées séparément dans 5ml de milieu LB liquide, supplémenté par l'antibiotique de sélection procaryote (la kanamycine), et incubées à 37°C sous agitation pendant la nuit. Un prélèvement de 3 ml de culture a été centrifugé pendant 30 s à 11 000g (les 2 ml restants sont conservés à 4°C pour une éventuelle maxipréparation). Le vecteur recombinant pUC57-*Elactiv'*, contenu dans le culot bactérien, a été purifié suivant le protocole du kit « NucleoSpin® Plasmid Quick Pure » (Qiagen, Courtaboeuf, France).

I.1.2.2. Maxipréparation

Après avoir vérifié la construction plasmidique (**Figure 31**), purifiée par le kit «NucleoSpin®Plasmid Quick Pure», une maxipréparation a pu être envisagée. Cette technique a été utilisée pour la production d'ADN plasmidique (pUC57-*Elactiv'*) en grande quantité. Les 2 ml restants de la préculture bactérienne (JM109) ont été ajoutés à 250 ml de milieu LB liquide, supplémenté par la kanamycine, et incubés à 37°C sous agitation pendant la nuit. Les cellules bactériennes ont été sédimentées par centrifugation pendant 15 min à 6000 g et à 4°C. pUC57-*Elactiv'*, contenu dans le culot bactérien, a été purifié suivant le protocole du kit « EndoFree Plasmid Maxi » (Qiagen). Le vecteur recombinant pUC57-*Elactiv'* a été purifié selon le même principe que celui de la minipréparation, c'est-à-dire par lyse alcaline.

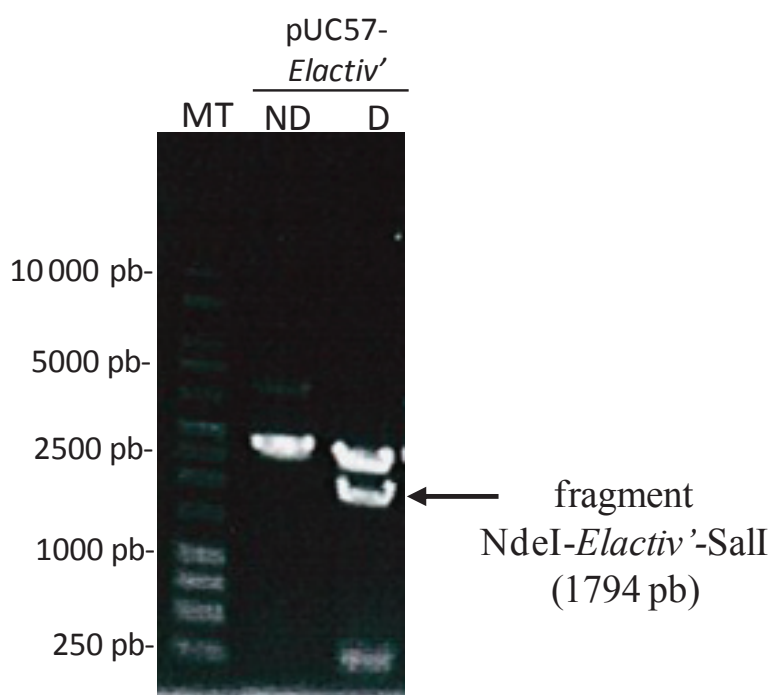


Figure 31: Profil de digestion du vecteur pUC57-*Elactiv'* par le couple d'enzyme de restriction *NdeI/Sall* sur gel d'agarose 0,5 % dans du tampon TAE. ND = Vecteur non digéré, D = Vecteur digéré par le couple d'enzyme de restriction *NdeI/Sall*.

I.1.3. Digestion des vecteurs pUC57-*Elactiv'* et pET30a par *NdeI/SalI*

Dans le but de cloner le gène *Elactiv'* dans le vecteur d'expression procaryote pET30a, au niveau des sites de restriction *NdeI* et *SalI*, le vecteur ainsi que le gène cible ont été digérés par le couple d'endonucléases de restriction *NdeI/SalI*.

Les enzymes de restriction *NdeI* et *SalI* sont commercialisées (Promega, Lyon, France) avec un tampon qui leur confère une activité maximale. Pour les tests analytiques, 5 µl d'ADN (1 à 5 µg d'ADN) obtenu par minipréparation ont été digérés en présence de 1 µl de tampon 10X, 1 µl de chaque enzyme à 10 U/µl (1 unité d'enzyme par µg d'ADN) et 3 µl d'eau stérile, pendant au moins une heure à 37°C. Pour les ADN préparatifs, 5 µg d'ADN de maxipréparation ont été digérés dans le tampon préconisé en présence de 1 µl de chaque enzyme de restriction, pendant 2 heures à 37°C. La réaction a été arrêtée en inactivant de façon irréversible les endonucléases 15 min à 65°C. Le fragment *NdeI-Elactiv'-SalI* et le vecteur linéarisé ont ainsi été obtenus.

I.1.4. Analyse des fragments d'ADN

Le fragment *NdeI-Elactiv'-SalI* et le vecteur linéarisé ont été analysés et isolés par purification sur gel d'agarose de concentration 0,7 à 2% par électrophorèse horizontale dans un tampon de migration TAE (Tris Acétate EDTA pour *Ethylenediaminetetraacetic acid*) (Euromedex, Souffelweyersheim, France) (Tris-HCl 40 mM pH 8 ; acide Acétique 20 mM, EDTA 1mM) (**Figure 31**). L'ADN a été dilué dans du tampon de charge 6X (10mM EDTA; glycérol 30% v/v ; bleu de bromophénol 0,25% p/v ; xylène cyanol 0,25% p/v) à une concentration finale de 1X. Le marqueur de taille utilisé a été le 1 kb ladder (New England Biolabs®, Hitchin, Royaume-Uni). Après une migration de 30 min sous une tension de 100V, les fragments d'ADN ont été visualisés par coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET à 200 µg/mL) pendant 5min et observés sur un transilluminateur ultraviolet. La zone du gel contenant les fragments d'ADN d'intérêts (*NdeI-Elactiv'-SalI* et pET30a linéarisé) a été découpée afin d'en extraire l'ADN et de le purifier sur une colonne d'affinité à l'aide du kit « QIAquick Gel Extraction » (Qiagen).

I.1.5. Purification des fragments d'ADN

I.1.5.1. Extraction de l'ADN à partir d'un gel d'agarose

Après avoir excisé les fragments d'ADN (NdeI-*Elactiv'*-SalI et pET30a linéarisé) du gel d'agarose, ils ont été pesés et incubés pendant 10 min à 50°C, dans du thiocyanate de guanidine nécessaire à la dissolution du gel. L'ADN plasmidique a ensuite été précipité avec de l'isopropanol et s'est lié à une résine échangeuse d'anions, en présence de concentrations élevées en sels. En effet, l'adsorption de l'ADN à la membrane de silice dépend du pH. Celle-ci est de 95% si le pH est inférieur ou égal à 7,5 et diminue radicalement lorsque le pH augmente. L'ADN a été rincé à l'éthanol à 70 %, et élué avec de l'eau stérile.

I.1.5.2. Extraction de l'ADN au phénol-chloroforme

Pour optimiser la purification de l'ADN d'intérêt, ce dernier a pu être purifié une seconde fois par la technique d'extraction au phénol-chloroforme. Cette technique a pu également être utilisée après une digestion par des endonucléases de restriction, afin d'éliminer l'excès de sels présents dans le tampon de restriction. A partir d'une solution de 50 µl d'ADN, 250 µl d'eau stérile et 300 µL de phénol-chloroforme ont été ajoutés. La solution a été vortexée pendant 1 min et centrifugée pendant 10 min à 9 300 g, à température ambiante. La phase aqueuse, contenant l'ADN plasmidique, a été récupérée délicatement. L'ADN a été précipité en ajoutant 30 µL d'acétate de sodium (AcNa 3M), 1 µL glycogène et 1,5 volume d'éthanol 100%, et congelé 30 min à -80°C. L'ADN a ensuite été sédimenté par centrifugation pendant 30 min, à 13 400 g, à 4°C, lavé avec 100 µl d'éthanol à 70 %, puis centrifugé une nouvelle fois. Le culot d'ADN purifié a été séché à l'air libre et remis en suspension dans 10 µl d'eau stérile.

I.1.6. Ligation de l'insert *Elactiv'* dans le vecteur d'expression pET30a

La ligation du fragment NdeI-*Elactiv'*-SalI et du vecteur pET30a linéarisé a été réalisée dans un volume final de 15 µl contenant 1 µl de la T4 DNA ligase à 3U/µl (Promega), 1 ml de tampon de ligation 10X (Tris-HCl 10 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, BSA (Bovin Serum Albumin) 0,1 mg/ml, ATP (Adénosine triphosphate) 0,5 mM), 1 µl d'ATP, 1 µl d'eau stérile et un rapport molaire vecteur/insert d'environ 1/2. La réaction a été effectuée à 4°C pendant la nuit.

I.1.7. Transformation des bactéries compétentes BL21 (DE3) par le vecteur recombinant pET30a-*Elactiv'*

Pour permettre l'expression de la protéine Elactiv', le vecteur recombinant pET30a-*Elactiv'* a été utilisé pour transformer les bactéries BL21 (DE3) compétentes. La totalité du produit de ligation a été mis en présence de 100 µl de bactéries compétentes. Après incubation pendant 10 min sur la glace, les bactéries ont été soumises à un choc thermique pendant 45 sec à 42°C suivi d'un retour sur la glace pendant 2 min, favorisant ainsi l'entrée massive d'ADN à l'intérieur des bactéries. Après ajout de 900 µl de milieu LB, dépourvu d'antibiotique, les bactéries ont été cultivées pendant 2 heures à 37°C, sous agitation (220 rpm). Les bactéries ont été centrifugées pendant 20 secondes à 1000 rpm et le culot bactérien a été repris dans 50 µl de milieu LB. La suspension bactérienne a ensuite été étalée sur un milieu sélectif solide LB-Agar + kanamycine et incubée pendant la nuit à 37°C. Pour valider le clonage, plusieurs clones ont été analysés par l'enzyme de restriction *EcoRV*, car le site de restriction *EcoRV* n'est plus présent à ce stade dans le vecteur recombinant pET30a-*Elactiv'*. La non digestion des clones par l'enzyme de restriction *EcoRV* confirme la bonne insertion du gène *Elactiv'* dans le vecteur d'expression procaryote pET30a (**Figure 32**).

De plus, pour être certain de la séquence clonée, un des clones a été séquencé par la société GATC Biotech SARL (Mulhouse, France) en aval du promoteur T7. Des stocks glycérol (glycérol 50%, milieu de culture bactérien 50%) ont été réalisés à partir des pré-cultures validées.

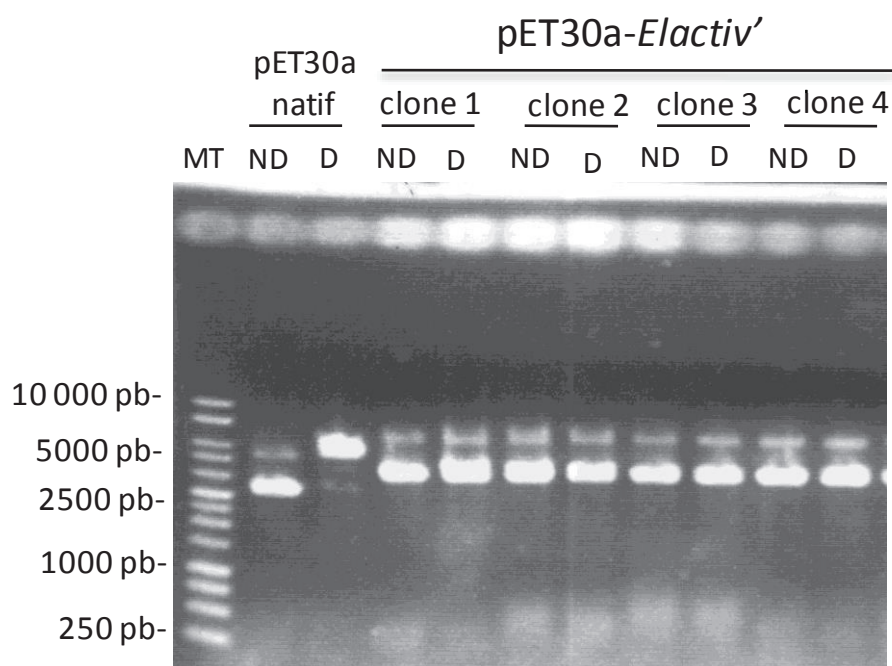


Figure 32: Profil de digestion du plasmide pET30a natif et du vecteur recombinant pET30a-*Elactiv'* par l'enzyme de restriction *EcoRV* sur gel d'agarose 0,5 % dans du tampon TAE. ND = Vecteur non digéré, D = Vecteur digéré par *EcoRV*.

I.2. Production Elactiv' en système procaryote

Le vecteur recombinant pET30a-Elactiv' a été utilisé pour transformer les bactéries *E. coli* compétentes BL21 (DE3) (Life Technologies). Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur un milieu sélectif solide LB-Agar contenant 50 µg/ml de kanamycine (Sigma-Aldrich). Une seule colonie a été utilisée pour inoculer 5 ml de LB contenant 50 µg/ml de kanamycine, une nuit sous agitation constante. La culture a été diluée au 100^{ème} et sa densité optique (DO) a été suivie à 600 nm : dès qu'elle a atteint 0,6, c'est-à-dire pendant la phase exponentielle de croissance bactérienne, l'expression d'Elactiv' a été induite par ajout de 1 mM d'IPTG (Sigma-Aldrich), pendant 4h à 30°C sous agitation constante. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation (10 080g pendant 10 min à 4°C) et le culot cellulaire résultant a été congelé pendant une nuit à -80°C. Les bactéries ont ensuite été remises en suspension dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 et incubées pendant 45 min à 80°C. Après 1h d'incubation dans la glace, les fractions soluble et insoluble ont été récoltées par centrifugation (15 000 g, 20 min à 4°C) puis analysées par SDS-PAGE. Ce protocole a permis la synthèse d'environ 20 mg d'Elactiv' par litre de culture, dosée à l'aide du kit Quant-iT Protein Assay (Life Technologies).

I.3. Purification par la méthode d'Inverse Transition Cycling (ITC)

I.3.1. Protocole

Elactiv' a été purifiée à partir de la fraction soluble d'*E. coli*, selon la méthode d'Inverse Transition Cycling (ITC) (Yeo, Keeley *et al.* 2011) grâce à sa capacité intrinsèque de coacervation. Cette méthode consiste en une précipitation réversible par un simple changement de température. En effet, Elactiv' est soluble à 4°C et insoluble à 42°C où elle coacerve. Du NaCl à 150 mM final a été ajouté au lysat bactérien, qui a ensuite été homogénéisé et chauffé pendant 10 min à 42°C, température à laquelle les molécules d'Elactiv' coacervent. Après 10 min de centrifugation à 14 000 g, le surnageant contenant les impuretés a été éliminé, et le culot contenant Elactiv' a été repris dans du PBS à 4°C, température à laquelle Elactiv' est soluble. La solution de protéine pure a été filtrée (porosité

I.3.2. Analyse de la purification par SDS-PAGE

La pureté d'Elactiv' a été analysée par la technique de séparation Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) décrite par Laemmli (Laemmli 1970). Elle consiste à séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire sur un gel d'acrylamide/bisacrylamide, en condition dénaturante dans un tampon de migration TG-SDS (Euromedex) (Tris-HCl 25 mM pH 8,3 ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1 % p/v). La protéine Elactiv' a été reprise dans du tampon Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; bleu de bromophénol 0,01 % p/v ; glycérol 10 % v/v ; SDS 2 % p/v ; DTT 50 mM) puis bouillie 5 min à 95°C afin d'assurer la dénaturation et la réduction complète de la protéine. La protéine dénaturée a été déposée sur le gel de polyacrylamide où elle a été, dans un premier temps, concentrée dans un gel de concentration (Acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) 4 % v/v ; Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0,1 % p/v ; persulfate d'ammonium (APS pour *Ammonium persulfate*) 0,05 % p/v ; N, N, N'-TétraMéthyl Ethylène Diamine (TEMED) 0,1 % v/v) à 90V. La protéine a ensuite été séparée, d'éventuels contaminants protéiques, en fonction de sa masse moléculaire dans un gel de séparation à 8% (pouvant atteindre 10% en fonction des protéines étudiées) (Acrylamide/bisacrylamide (37,5/1) 8% v/v ; Tris-HCl 375 mM pH 8,8 ; SDS 0,1 % p/v ; APS 0,05 % p/v ; TEMED 0,5 % v/v) à 120 V dans un système Mini Protean III (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Après la migration, les protéines contenues dans le gel ont été colorées aux nitrates d'argent à l'aide du kit Pierce Silver Stain (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

I.3.3. Analyse de la purification par western-blot anti-FLAG

Les expériences de SDS-PAGE ont été réalisées comme décrit dans la section I.3.2, puis la protéine Elactiv' a été transférée électriquement sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF, Immobilon-P, Merck Millipore) préalablement activée au méthanol 100%, puis dans le tampon de transfert TG (Tris-HCl 25 mM, 192 mM Glycine, Méthanol 20 % v/v). Le sandwich gel-membrane a été plongé dans une cuve (système Mini Trans-Blot, Biorad) contenant du tampon de transfert. Le montage a alors été soumis à un courant d'intensité constante de 220 mA pendant 2h à 4°C. L'efficacité et la qualité du transfert ont été évaluées par une coloration de la membrane dans une solution de rouge Ponceau 0,2 % (p/v), acide trichloroacétique 5 % (p/v), suivie d'un rinçage à l'eau.

La membrane a ensuite été saturée par une solution de lait écrémé 5 % en tampon TBS (Tris 0,24 M pH 7,4 ; NaCl 1,37 M ; KCl 26,8 mM) additionné de 0,05 % de Tween-20 (TBS-T) pendant 45 min à température ambiante, afin d'éviter des interactions non spécifiques des anticorps de révélation. La membrane a été incubée en présence de l'anticorps primaire, anticorps de souris anti-Flag (F3165, Sigma-Aldrich) diluée au 1/5000^{ème} dans du TBS-T, dilué dans une solution de lait 2% en TBS-T, sous agitation rotative douce pendant la nuit à 4°C. Après trois rinçages de 5 min en TBS-T à température ambiante, la membrane a été incubée en présence d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin (32460, Thermo-scientifique) ou anti-IgG de souris couplé à la peroxydase de raifort (32430, Thermo- scientifique) pendant 1h à température ambiante sous agitation rotative. Après cinq rinçages en TBS-T, la membrane a été incubée durant 5 min avec le substrat permettant la chimiluminescence (ECL pour *Enhanced chemiluminescence*) (Super Signal West Pico/Femto ECL substrate, Thermo-Scientifique). La détection du signal a été réalisée par exposition d'un film radiographique (BioMax Light Films, Sigma-Aldrich) ou par une caméra refroidie (caméra fusion FX, Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

I.3.4. Analyse de la purification par spectrométrie de masse

La solution d'Elactiv' pure à 1 mg/ml a été analysée par spectrométrie de masse au sein de la plateforme « Protein Sciences Facility » (PSF), installée dans les locaux de l'IBCP (Lyon, France), afin de confirmer la présence du pont-disulfure à l'extrémité C-terminale de la protéine. La digestion de la protéine Elactiv' par la trypsine, suivie de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS pour *Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*), en utilisant le mode de dissociation ETD (Electron transfert dissociation), a permis de générer plusieurs peptides dont un, le peptide [579-594] qui correspond à l'extrémité C-terminale de la protéine Elactiv' (PGGGACLGKACGRKRK). L'analyse de la masse moléculaire du peptide [579-594], similaire à la masse moléculaire théorique pour le même peptide en présence du pont disulfure, a permis de confirmer la présence du pont-disulfure à l'extrémité C-terminale de la protéine Elactiv'.

II. Caractérisations physico-chimiques de la protéine Elactiv'

II.1. Spectroscopie par dichroïsme circulaire

Les structures secondaires de la protéine Elactiv' ont été déterminées par dichroïsme circulaire, en comparaison avec la tropoélastine humaine recombinante.

II.1.1. Principe

La lumière polarisée linéaire peut être décomposée en deux composantes circulaires gauche (ϵ_L) et droite (ϵ_R) de même amplitude et de même intensité. Lorsque la lumière polarisée linéaire passe au travers d'un échantillon pourvu d'une activité optique, les deux composantes ϵ_L et ϵ_R ne sont pas absorbées de la même manière par l'échantillon. L'absorption préférentielle de l'une de ces deux polarisations résulte en une déviation de la résultante qui décrit une ellipse et non un cercle. Cette déviation est appelée dichroïsme circulaire (**Figure 33**). La mesure de la différence d'absorption des deux composantes gauche et droite de la lumière polarisée linéaire permettra donc d'obtenir des informations sur la conformation des différents chromophores (Kelly, Jess *et al.* 2005).

Dans les protéines, les chromophores d'intérêt pour la technique de dichroïsme circulaire sont de trois types : les ponts disulfures (absorption autour de 260 nm), les liaisons peptidiques (absorption jusqu'à 240 nm) et les chaînes latérales des acides aminés aromatiques (absorption entre 260 et 320 nm). Selon le repliement en hélice α ou en feuillet β des protéines, la géométrie de l'empilement des différents chromophores ne sera pas le même, modifiant ainsi considérablement le signal dichroïque observé (**Figure 34**).

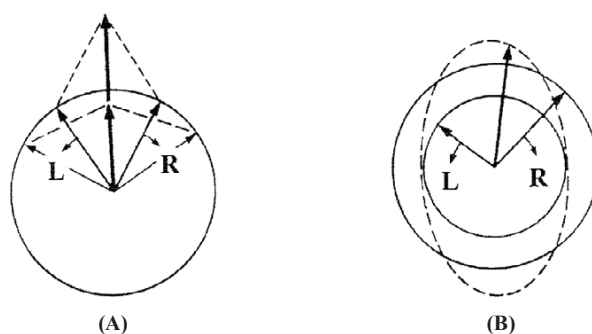


Figure 33 : Origine de l'effet observé en spectroscopie de dichroïsme circulaire. La lumière polarisée circulaire gauche (ϵ_L) et droite (ϵ_R) composent la lumière polarisée linéaire. (A): les deux composantes ont la même amplitude; (B): les deux composantes n'ont pas la même amplitude et la résultante (ligne pointillée) est une ellipse (adaptée de Kelly, Jess *et al.* 2005).

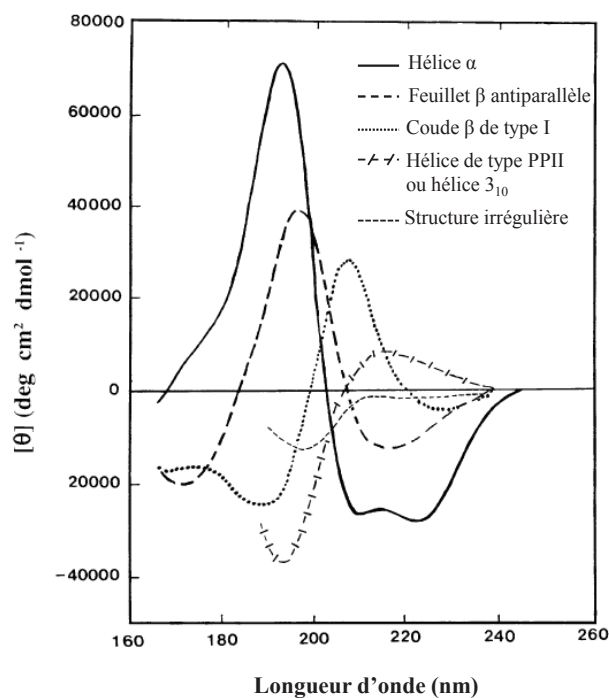


Figure 34: Spectres de dichroïsme circulaire des structures secondaires de protéines.

Le spectre d'une protéine comportant essentiellement des hélices α présente trois bandes caractéristiques (positive à 190 nm, négative à 208 nm et à 222 nm). Le spectre d'une protéine comportant essentiellement des feuillets β antiparallèles présente deux bandes caractéristiques (positive à 195 nm, négative à 218 nm). Le spectre d'une protéine comportant essentiellement des hélices de type polyproline II (PPII) ou hélices 3_{10} présente deux bandes caractéristiques (négative à 195 nm et positive à 215 nm). Le spectre d'une protéine non structurée présente une bande caractéristique négative à 198 nm et un épaulement négatif à 220 nm (adaptée de Kelly, Jess *et al.* 2005).

II.2.2. Acquisition des données expérimentales

Les spectres de dichroïsme circulaire d'Elactiv' et de la tropoélastine humaine (hTE) (Sigma–Aldrich) ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Chirascan (Applied Photophysics, Leatherhead, Royaume-Uni) calibré avec une solution aqueuse d'acide 1S-(+)-10-camphorsulfonique. Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés dans l'UV lointain, entre les longueurs d'onde 180 et 260 nm (avec un pas de 0,2 nm), pour une gamme de température variant de 20°C à 60°C. Les solutions d'Elactiv' et hTE ont été diluées à une concentration de 0,2 mg/ml dans du tampon phosphate pH 7,4 (KH_2PO_4 10,6 mM, NaF 1,54 M et $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mM), puis transférées dans des cuvettes en quartz possédant un trajet optique de 1 mm (Hellma, Müllheim, Allemagne). Le contrôle de la saturation du signal a été effectué en suivant la tension du récepteur. Tous les spectres ont été lissés et corrigés en soustrayant le spectre du tampon phosphate par le logiciel ProData Viewer.

II.2. Caractérisation thermique : Diffusion Dynamique de la Lumière

La Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS pour *Dynamic Light Scattering*) a permis d'établir le profil thermique d'Elactiv, c'est à dire le profil de la taille de ses agrégats en fonction de la température, dans le but de déterminer sa température optimale de coacervation (Tt).

II.2.1. Principe

La DLS, également appelée diffusion quasi élastique de la lumière, est une technique rapide, sensible, non invasive et bien adaptée pour la mesure de la taille et de la distribution de la taille, inférieures à 1nm, des molécules en solution (Lomakin, Teplow *et al.* 2005). La DLS mesure les fluctuations d'intensité lumineuse émanant à partir d'une solution colloïdale irradiée par un laser. Ces fluctuations contiennent des informations sur la nature physique des molécules dans la solution d'échantillon. En effet, les molécules dispersées dans un fluide bougent de façon aléatoire et à des vitesses constantes et relatives à leur taille. Il s'agit du mouvement Brownien, modélisé par la relation de Stokes-Einstein (**Figure 35**), qui est causé par les collisions des molécules de solvants avec la surface des molécules de protéine en solution. De ce fait, les petites molécules en suspension se déplacent plus rapidement et les plus grosses molécules plus lentement. Comme l'appareil est muni d'une source laser monochromatique (632,8 nm), le déplacement des molécules entraîne la création d'interférences constructives et destructives. Ainsi, l'intensité de la lumière détectée varie avec le déplacement des molécules.

$$d(H) = \frac{K_B \cdot T}{3 \pi \eta D_t}$$

$d(H)$: Diamètre hydrodynamique (taille particule)
 D_t : Coefficient de diffusion transversal (mesuré par la diffusion dynamique de la lumière)
 K_B : constante de Boltzmann (connue)
 T : température thermodynamique (contrôlée)
 η : viscosité dynamique

Figure 35: Relation de Stokes-Einstein qui lie le coefficient de diffusion mesuré par diffusion dynamique de la lumière et la taille des molécules.

La fluctuation de l'intensité lumineuse peut ensuite être corrélée à la taille des molécules en suspension si les valeurs de température, viscosité, indices de réfraction du milieu des molécules sont connues et constantes. Il est indispensable que la température soit constante sinon il se crée des courants de convection qui entraîneront des mouvements aléatoires des molécules faussant ainsi les résultats. La modulation de l'intensité lumineuse en fonction du temps, mesurée par la DLS, donne comme résultat brut un corrélogramme dont l'équation de la courbe permet d'obtenir la valeur du coefficient de diffusion de translation (D), permettant ensuite grâce à l'équation de Stokes-Einstein de déterminer la valeur du diamètre hydrodynamique des molécules en suspension. Par conséquent, plus la corrélation entre les valeurs d'intensité lumineuse subsiste sur une longue période de temps (plus la variation de l'intensité diffusée est moindre au cours du temps), plus les molécules sont grosses (**Figures 36-37**).

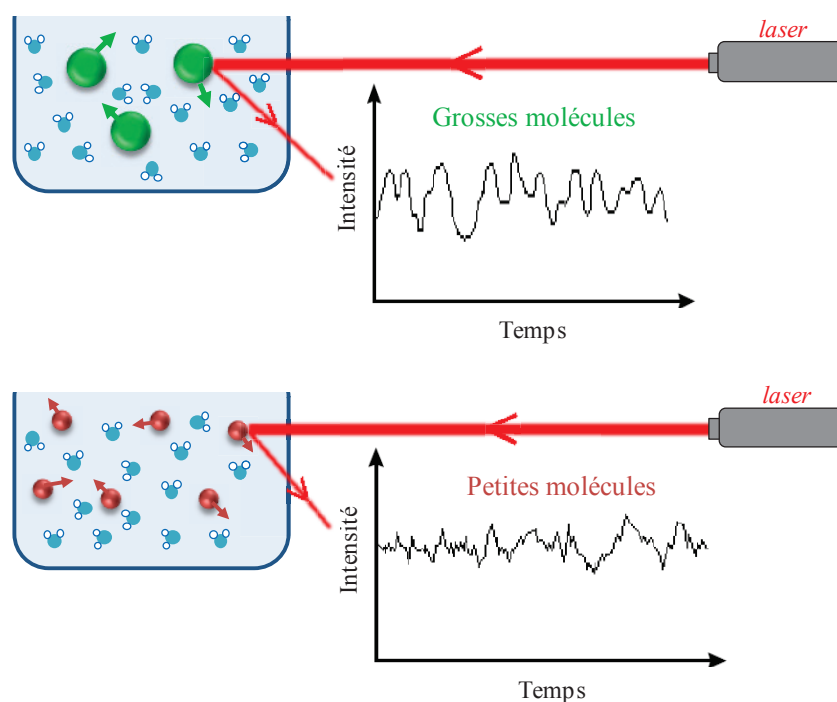


Figure 36: Variation hypothétique de l'intensité diffusée par des petites et des grosses molécules en DLS (<http://www.malvern.co.uk>).

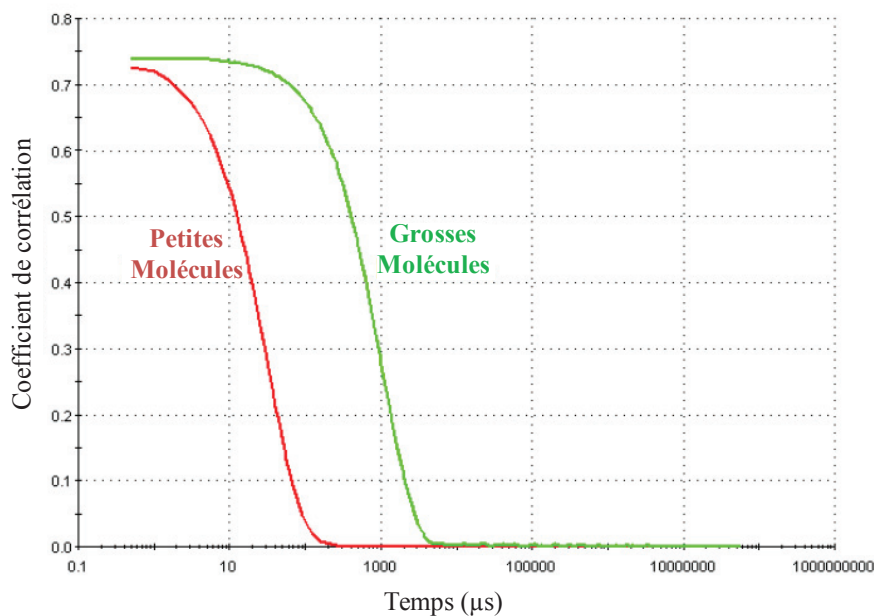


Figure 37: Exemples de corrélogrammes, obtenus en DLS, pour une population de petites et de grosses molécules en suspension (<http://www.malvern.co.uk>).

II.2.2. Acquisition des données expérimentales

L'étude de l'agrégation des molécules d'Elactiv' en solution, plus communément appelé le processus de coacervation, a été suivie par la méthode de diffusion dynamique de la lumière en utilisant le Zetasizer Nano S ZEN1600 de la compagnie Malvern Instrument (Royaume-Uni). La taille des agrégats d'Elactiv' a été mesurée pour une gamme de températures variant de 20 à 60 °C, avec un temps de stabilisation de 5 min entre chaque essai. La solution d'Elactiv' a été préparée à une concentration de 1 mg/ml dans du PBS, pH 7,4. Onze acquisitions ont été réalisées pour chaque mesure afin de déterminer la taille globale des agrégats, dans le but d'obtenir une valeur moyenne finale à température constante.

II.3. Modèle d'auto-assemblage *in vitro* des molécules Elactiv' : techniques de microscopie électronique

II.3.1. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission permet d'obtenir des informations sur la morphologie, la structure (amorphe, organisée : cristallin, lamellaire...) et la composition (intérieur creux ou plein) des agrégats d'Elactiv' à l'échelle nanométrique.

II.3.1.1. Principe

Le microscope électronique à transmission (MET) utilise un faisceau d'électrons à haute tension, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées pour focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon. Selon la densité de l'échantillon qu'ils rencontrent, les électrons seront plus ou moins diffusés et en passant dans le vide ou au travers de la matière, ils parviendront à un écran phosphorescent. Lorsqu'ils frappent l'écran, ils induisent l'émission de lumière qui crée une image et qui permet la visualisation de l'échantillon déposé sur la grille de microscope. Pour la prise de photographies, les électrons sont analysés par un détecteur, une caméra à transfert de charge (CCD), qui traduit le signal en image contrastée grâce à un logiciel de traitement d'image. Il en résulte une projection bidimensionnelle des particules.

II.3.1.2. Préparation des échantillons – coloration négative

L'échantillon biologique doit être préparé selon un protocole précis, qui doit à la fois conserver sa structure et être conducteur pour laisser passer le faisceau d'électrons. Le matériel biologique est essentiellement composé d'atomes légers (carbone, hydrogène, oxygène,...), et possède par conséquent un faible pouvoir diffuseur. En microscopie électronique en transmission, afin d'augmenter le contraste des images de l'échantillon, des métaux lourds sont utilisés. Le sel d'atomes lourds (ou colorant) va se fixer préférentiellement à la surface de l'échantillon adsorbé, créant ainsi son "empreinte" dans le colorant. Lors du passage du faisceau d'électrons, du fait de son numéro atomique élevé, le contrastant dévie plus les électrons que la grille de carbone support ou que l'échantillon biologique, composés d'atomes légers (C, H, O, N, ...). Par conséquent, l'échantillon biologique apparaît plus clair que ce qui l'entoure, d'où le nom de coloration négative.

II.3.1.3. Protocole

Pour la microscopie électronique à transmission, plusieurs solutions d'Elactiv' ont été préparées suivant une gamme de concentrations variant de 120 µg/ml à 2 mg/ml dans du PBS à 4°C. Toutes les solutions d'Elactiv' ont été équilibrées à 42° C pendant 15 min, pour induire la coacervation de la protéine. Les solutions ont été homogénéisées. Une goutte de 10 µl de chaque solution a été prélevée puis déposée sur une boîte de pétri chauffée à 42°C et, préalablement recouverte d'un film plastique de paraffine (Parafilm M[®], Dominique Dutscher, Brumath, France) assurant l'hydrophobicité de la surface. Une grille de cuivre, revêtue d'un film formvar-carbone (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Royaume-Uni) a ensuite été retournée sur chaque goutte d'Elactiv' (**Figure 38**). Après 2 min, la grille a été égouttée en enlevant l'excédent à l'aide d'un papier filtre. L'échantillon a été fixé en retournant la grille de formvar-carbone sur une goutte de glutaraldéhyde 2%, pendant 2 min à 42°C. L'excédent de fixateur a été enlevé à l'aide d'un papier filtre. La grille a été rincée trois fois dans du PBS, pendant 10 sec à température ambiante, en la retournant successivement sur des gouttes d'eau ultra pure. La grille a ensuite été contrastée pendant 10 sec à température ambiante, en la retournant une dernière fois sur une goutte d'agent contrastant, l'acide phosphotungstique pH 7 (1 M KOH), puis séchée à l'air libre. Les observations ont été réalisées avec un microscope électronique à transmission Philips CM120, équipé d'une caméra numérique CDD (Gatan), au Centre Technique des Microstructures à l'Université de Lyon 1.

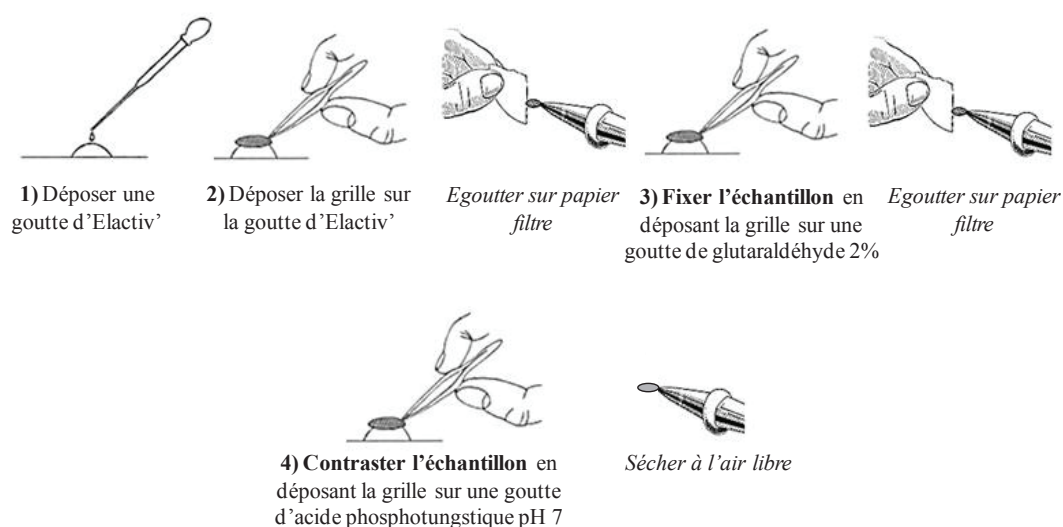


Figure 38: Protocole de coloration négative pour la microscopie électronique à transmission.

II.3.2. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage permet, en plus d'une analyse morphologique structurale, d'obtenir des informations sur l'organisation spatiale, l'agencement des agrégats d'Elactiv' à l'échelle nanométrique.

II.3.2.1. Principe

Un microscope électronique à balayage en transmission (MEB) fonctionne comme un microscope MET, à la différence près que le faisceau d'électrons est focalisé sur une très petite surface et qu'il est balayé sur toute la surface de l'échantillon biologique. Le balayage se fait de façon matricielle ce qui permet de construire une image point par point de l'échantillon déposé sur la grille, par collection des électrons secondaires émis par la surface de l'échantillon.

II.3.2.2. Protocole

Pour la microscopie électronique à balayage, les solutions d'Elactiv' ont été préparées à une concentration de 2 mg/ml dans du PBS à 4°C. Pour l'étude de la réticulation des agrégats d'Elactiv, de la génipine (Sigma-Aldrich) a été ajoutée aux solutions d'Elactiv pour atteindre une concentration finale de 50 mM.

La génipine est un excellent agent de réticulation naturel des protéines. En effet, cette molécule extraite du fruit de la plante *Genipa americana* (Djerassi, Nakano *et al.* 1961), est 10 000 fois moins cytotoxique que le glutaraldéhyde pour la souche de fibroblastes 3T3 (Schek, Michalek *et al.* 2011). En réticulant les chaînes latérales des lysines, par la réaction avec les groupements amines primaires, la génipine donne une coloration bleue (Gao, Gan *et al.* 2014).

Toutes les solutions ont été équilibrées à 42°C pendant 15 min pour induire la coacervation et la réticulation d'Elactiv. Une goutte (60 µl) de chaque solution a été déposée sur une lamelle en verre de 12 mm de diamètre (Braunschweig, Allemagne), qui a ensuite été séchée à l'air libre pendant 15 min à 42°C. Les lamelles ont été lavées à plusieurs reprises dans du PBS avant la déshydratation dans des solutions de concentrations croissantes en éthanol (50 à 100%).

Les échantillons ont ensuite été trempés dans de l'hexaméthylidisilazane 100% (Sigma-Aldrich) pendant 3 min et transférés dans un dessiccateur pendant au moins 2 heures afin d'éviter la contamination de l'eau et faciliter l'évaporation lente des résidus de solvant. Une fois sec, les échantillons ont été collés sur des supports en aluminium avec de la laque d'argent avant d'être métallisés par pulvérisation cathodique d'une fine couche de cuivre d'environ 3 nm d'épaisseur (Bal-tec MED 020, Leica Microsystems SAS, Nanterre, France). La métallisation a pour objectif de rendre l'échantillon conducteur aux électrons évitant ainsi l'accumulation des charges parasites négatives à la surface de l'échantillon au cours de son observation. L'imagerie a été réalisée en utilisant un microscope électronique à balayage Hitachi S800 FEG au Centre Technique des Microstructures à l'Université de Lyon 1.

III. Caractérisation de la protéine Elactiv' comme support pour la culture 2D de fibroblastes dermiques humains

III.1. Les fibroblastes dermiques humains

Souche utilisée

La souche de fibroblastes dermiques primaires humains NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblast*), isolée à partir de prépuce néonatal, a été obtenue auprès de PromoCell (Heidelberg, Allemagne). Les cellules ont été reçues au passage 2 (P2), amplifiées au passage 4 (P4) et utilisées jusqu'au passage 8.

Sous-culture des fibroblastes

Les NHDF, ont été cultivés entre les passages p5 à p8. Le milieu de culture utilisé était un mélange de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-F12 1:1, Glutamax (Life technologies) supplémenté de Sérum de Veau Foetal (SVF, Life technologies) à 10% et de pénicilline 100U/ml-Streptomycine 0,1 mg/ml (nommé milieu DMEM F-12, SVF 10 %, P/S 1%). Les cellules ont été incubées à 37°C sous une atmosphère saturée en eau et comprenant 5 % CO₂. Le milieu de culture a été changé tous les deux jours. A confluence, les fibroblastes ont été lavés trois fois au PBS (*Phosphate Buffered Saline*), et incubés pendant 4 min à 37°C avec de la Trypsine-EDTA (0,5g/l et 0,2g/l respectivement), puis ré-ensemencés à faible densité (20% de confluence).

III.2. Viabilité et prolifération des fibroblastes en présence d'Elactiv': test CyQuant[®]

Le kit de prolifération cellulaire CyQuant[®] (Molecular probes, Invitrogen, Saint-Aubin, France) a été utilisé dans le but d'évaluer l'effet de la protéine Elactiv' sur la viabilité (en phase homogène) et la prolifération cellulaire (en phase hétérogène) des NHDF.

Avant le test de prolifération cellulaire, Elactiv', la tropoélastine humaine (hTE, Sigma-Aldrich), du collagène de type I (Gibco, Thermo scientific, Illkirch, France) et de la BSA (*Bovin Serum Albumin*, fraction V, Euromedex) ont été adsorbés sur une plaque 96 puits (0,32 cm²/puits) à une concentration finale de 10 µg/ml dans du PBS pendant 2h à 4°C. La plaque a ensuite été rincée trois fois au PBS.

Pour les tests de viabilité et de prolifération cellulaire, les NHDF ont été ensemencés respectivement sur des plaques 96 puits non traitées et traitées à une densité cellulaire de 6.10³ cellules.cm⁻² et incubés une nuit dans du milieu complet (DMEM F-12, SVF 10%, P/S 0,1 %) (Life technologies) afin de favoriser l'adhérence des cellules.

Pour les tests de viabilité cellulaire, la protéine Elactiv' et le peptide de l'élastine VGVAPG (GenScript), dilués dans du milieu complet à 1 et 10 µg/ml, ont été ajoutés 24 h après l'ensemencement des NHDF. La viabilité et la prolifération cellulaire ont été suivies pendant 10 jours. Les milieux de culture ont été rafraîchis tous les 2 jours, et à chaque temps le milieu a été éliminé et les plaques congelées à sec à -80 °C. La quantité totale d'acides nucléiques obtenue après lyse cellulaire a été déterminée à l'aide du kit CyQuant[®] selon les instructions du fabricant, en mesurant la fluorescence dans un lecteur microplaque Tecan Infinite[®] M1000PRO (Tecan, Männedorf, Suisse) à 480 nm et 520 nm pour des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives.

III.3. Etudes des sites d'interactions de la protéine Elactiv' avec les fibroblastes : test d'adhésion

Pour savoir si le motif C-terminal GRKRK et le motif VGVAPG d'Elactiv' (connus respectivement pour se lier à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et à l'EBP (*Elastin-Binding Protein*) dans la tropoélastine humaine) sont capables d'induire l'adhérence des fibroblastes à travers les molécules transmembranaires, l'adhérence des NHDF sur une surface recouverte d'Elactiv' a été étudiée à l'aide de l'anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ et/ou d'un bloqueur de l'EBP, le L-lactose (Mecham, Hinek *et al.* 1989).

Préparation des plaques de culture

La protéine Elactiv' a été adsorbée sur des lames en verre 8 puits (labteks, Merck, Millipore) à une concentration finale de 10 µg/ml dans du PBS, pendant 2h à 4°C. La protéine non adsorbée a été éliminée et les puits ont été lavés trois fois dans du PBS.

Protocole

Des NHDF, proches de la confluence, ont été détachés en les incubant avec de l'EDTA 1mM pendant 5 min à 37°C. L'utilisation de l'EDTA, contrairement à la trypsine, évite la dégradation des protéines de surface telles que les intégrines. La suspension cellulaire ainsi obtenue a été centrifugée à 200 g pendant 5 min à température ambiante, puis le culot cellulaire a été remis en suspension dans 1 ml de milieu sans sérum (Fibroblast Growth Medium, FGM, PromoCell). La densité cellulaire a été comptée et ajustée à 4.10^4 cellules.ml⁻¹ dans du FGM. Avant l'ensemencement sur les lames en verre 8 puits sur lesquels la protéine Elactiv' a été préalablement adsorbée, les cellules ont été pré-incubées pendant 45 min avec l'anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha_5\beta_3$ (clone LM609, Merck, Millipore) à une concentration finale de 20µg/ml (PBS) et/ou avec du L-lactose (Euromedex) à une concentration finale de 3,6 mg/ml (PBS). Les cellules ont ensuite été ensemencées sur les lames en verre. Le milieu a été aspiré et les puits rincés trois fois au PBS, 90 min après l'ensemencement. Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% (Sigma-Aldrich) pendant 20 min à température ambiante, puis rincées trois fois dans du PBS. Les noyaux et le cytosquelette d'actine des cellules ont été marqués respectivement avec du Hoechst (Sigma-Aldrich) et de la Phalloïdine-TRITC (Tétraméthylrhodamine, Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 1 µg/ml (PBS) pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. Après trois rinçages au PBS, les lamelles ont été montées en milieu aqueux avec une solution de Permafluor (LabVision, Thermo-scientifique). Les lamelles ont été séchées une nuit à l'air ambiant et à l'obscurité avant l'observation. Les cellules ont été observées au microscope à épifluorescence Axioplan Imaging (Zeiss). La capture d'image a été réalisée par une caméra CCD Coolsnap *fx* (Photometrics) à l'aide du logiciel MetaVue (Universal Imaging Corporation). Les cellules attachées ont été analysées grâce au logiciel Image J[®] (Schneider, Rasband *et al.* 2012).

III.4. Influence de la protéine Elactiv' sur la différenciation myofibroblastique

Préparation des plaques de culture

La protéine Elactiv', du collagène de type I (Gibco, Thermo-scientifique) et de la BSA (fraction V, Euromedex) en contrôle négatif, ont été adsorbés à une concentration de 10 µg/ml dans du PBS, sur des lamelles rondes en verre de 1,4 cm² de surface, préalablement déposées dans des plaques 24 puits standards (1,88 cm²/puits). La plaque a été incubée pendant 2h à 4°C, puis lavée trois fois au PBS.

Observation du cytosquelette d'actine des NHDF

Les NHDF ont étéensemencés à une densité de 8000 cellules.cm⁻² dans du DMEM F-12, SVF 10%, P/S 1% (Life Technologies) sur les lamelles rondes en verre, préalablement déposées dans les plaques 24 puits. Après 48h de culture, le milieu a été aspiré et les puits rincés trois fois au PBS. Les NHDF ont ensuite été fixés, colorés au Hoechst (Sigma-Aldrich) et à la phalloïdine-TRITC (Sigma-Aldrich) puis observés au microscope, selon le même protocole détaillé dans le paragraphe III.3. « Etudes des sites d'interactions d'Elactiv' avec les fibroblastes : test d'adhésion ».

Immunomarquage de l'actine α -SMA des NHDF

Les NHDF ont étéensemencés comme précédemment pour l'observation du cytosquelette d'actine. Après 48h de culture, le milieu a été aspiré et les puits rincés trois fois au PBS. Les NHDF ont été fixés au méthanol pur pendant 10 min à -20°C, puis rincés trois fois au PBS. Un traitement à la BSA 5% en PBS (p/v) pendant 1 heure à température ambiante a permis de saturer les sites aspécifiques. L'anticorps primaire : anti- α SMA (polyclonal, lapin, ab5694) (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) dilué au 1/400^{ème} dans du PBS/BSA 0,5% (p/v), a été incubé 1h à température ambiante en chambre humide. Après trois rinçages de 5 min en PBS, l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'Alexa fluor 488 (Invitrogen[®] A11008) a été dilué au 1/600^{ème} dans du PBS/BSA 0,5% (p/v), et incubé 1h à température ambiante et à l'obscurité. Après cinq rinçages au PBS, les noyaux ont été contre-marqués au colorant de Hoechst (Sigma Aldrich), dilué à 1 µg/ml dans du PBS pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité. Après trois rinçages au PBS, les lamelles ont été montées en milieu aqueux avec une solution de Permafluor (LabVision, Thermo-scientifique).

Les lamelles ont ensuite été séchées une nuit à l'air ambiant et à l'obscurité avant l'observation au microscope à épifluorescence Axioplan Imaging (Zeiss).

III.5. Influence de la protéine Elactiv' sur la sécrétion des gélatinases matricielles : zymographie

Au cours de cette étude, nous avons cherché à savoir si la présence d'Elactiv, dans des cultures 2D de fibroblastes dermiques humains, pouvait entraîner une modulation du relargage ou de l'activation des proMMP-2 et proMMP-9.

Ce protocole a également été utilisé, dans un même objectif, avec les DGL (G2-G4) (Dendrigraft de poly(L-lysine)).

III.5.1. Principe

La technique de zymographie consiste en une séparation électrophorétique des protéines dans un gel SDS-PAGE contenant 0,1 % de gélatine. Les gélatinases, à savoir les proMMP-2 et -9, ainsi que leurs formes actives peuvent être mises en évidence par leur capacité à dégrader leur substrat, la gélatine, laissant ainsi apparaître des plages de lyse blanches après coloration au bleu de Coomassie de la gélatine (Kleiner and Stetlerstevenson 1994) (**Figure 39**).

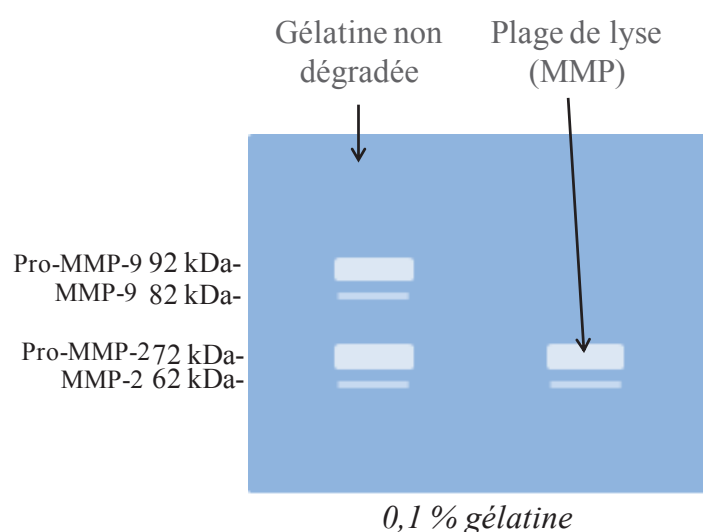


Figure 39 : Schématisation d'un zymogramme représentant les activités gélatinolytiques des proMMP-2 et -9 ainsi que leurs formes actives.

III.5.2. Protocole

Les NHDF ont étéensemencés à une densité de 3.10^4 cellules.cm⁻² dans du milieu complet (DMEM F-12, SVF 10%, P/S 1%) (Life Technologies). Après une nuit, les cellules ont été lavées avec du milieu de culture sans SVF, puis cultivées pendant 48 h en absence de SVF. Les milieux conditionnés ont été prélevés et centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 4°C, et les surnageants ont été conservés. Les échantillons ont ensuite été dilués dans du tampon laemmli non réducteur (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; bleu de bromophénol 0,01 % p/v ; glycérol 10 % v/v ; SDS 2 %) puis bouillis 5 min à 95°C, avant leur migration dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE 10 %) contenant 0,1 % de gélatine, en conditions dénaturantes et non réductrices. La migration dans le gel de concentration a été effectuée sous une tension de 90 V puis 140 V pour le gel de séparation et ce toujours à 4°C. Après deux lavages de 30 min au Triton X-100 2,5 % (v/v), le gel a été incubé à 37°C pendant environ 24h dans le tampon d'incubation (Tris/HCl 52mM pH 7,2, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, Triton X-100 0,01% v/v). La coloration a été effectuée avec un tampon de coloration (méthanol 20 % v/v, acide acétique 10 % v/v, colorant R250 0,2 % p/v) pendant environ 1 heure. Le gel a ensuite été décoloré avec le même tampon en omettant le colorant.

III.6. Etude de la dégradation d'Elactiv' par les métalloprotéases matricielles

Pour la cinétique de dégradation d'Elactiv' par les métalloprotéases matricielles (MMP), les rhMMP-12 et proMMP-2 (fournies par Elise Lambert, MCU à l'IGFL, Lyon, France) ont été diluées respectivement à 50 µg/ml et 12,5 µg/ml dans du tampon analytique (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, Brij-35 0,05 % v/v). Ensuite, les rhMMP-12 et proMMP-2 ont été activées par addition d'acétate de p-aminophénylmercurique (APMA) (Calbiochem, Molsheim, France), aux concentrations finales respectives de 1 mM et 2 mM, à 37 °C pendant 4h. 1µg d'Elactiv' et 1 µg d'hTE, utilisée en tant que témoin positif, ont été incubées à 30°C en présence des MMP activées, soit 5 µg/ml de rhMMP-12 ou 1,25 µg/ml de MMP-2, seules ou en présence de 10 mM d'EDTA. Après 0, 60 et 120 min, les réactions ont été arrêtées par ajout de 10 mM d'EDTA. La capacité de la rhMMP-12 et de la MMP-2 à dégrader Elactiv' et hTE a été évaluée par analyse par western-blot en utilisant un anticorps anti-alpha élastine, ab21607 (Abcam).

III.7. Analyse protéique à partir de fibroblastes en western-blot

III.7.1. Extraction protéique

L'extraction des protéines a été réalisée à partir de fibroblastes en culture. Le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS froid. Le PBS a été éliminé et le tapis cellulaire a été lysé sur la glace dans du tampon NP-40 (NaCl 150 mM, Hépès 50 mM pH 7,4, EDTA 5mM, glycérol 10% v/v, NP-40 1% v/v) complémenté extemporanément avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1:25 (Complete mini protease inhibitor cocktail tablets, Roche, Meylan, France) et Na_3VO_4 1 mM. Les cellules ont été récoltées par grattage avec un râteau stérile. Après homogénéisation au vortex, le lysat a été incubé sur la glace 15 min puis centrifugé 20 min à 10 000 rpm, à 4°C. L'extrait protéique (surnageant) a été récupéré et stocké à -20°C.

III.7.2. Dosage des protéines totales

Les dosages des extraits protéiques ont été réalisés à l'aide du kit BCA (acide bicinchoninique) Protein Assay Reagent (Thermo-scientifique). Le principe du dosage consiste en la réduction des ions Cu^{2+} (réactif B) en Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines en milieu alcalin (réactif A). Le BCA chélate les ions Cu^+ avec une très forte spécificité pour former un complexe soluble coloré en violet. La réaction est mesurée par l'absorbance du complexe Cu^+ final à une longueur d'onde de 560 nm. L'absorbance à 560 nm est directement proportionnelle à la concentration protéique de chaque échantillon, laquelle est comparée à une courbe standard établie de concentrations connues de BSA.

III.7.3. Analyse des protéines totales par western-blot

Les protéines ont été analysées par la technique de western-blot décrite dans les paragraphes I.3.2. « SDS-PAGE » et I.3.3. « western-blot ». Les anticorps primaires utilisés sont répertoriés dans le tableau suivant (**Tableau 1**) avec la dilution à adopter.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Hôte	Saturation	Dilution	Taille
Anti-Intégrine α_5	Abcam	ab93943	souris	Lait 5%	1/1000 ^{ème}	115
Anti-Intégrine α_v	Abcam	ab76609	lapin	Lait 5%	1/1000 ^{ème}	128
Anti-Intégrine β_1	Abcam	ab52971	lapin	Lait 5%	1/1000 ^{ème}	140
Anti-Fibronectine	Abcam	ab23750	lapin	Lait 5%	1/1000 ^{ème}	265
Anti- α -SMA	Abcam	ab5694	lapin	Lait 5%	1/1000 ^{ème}	42 kDa
Anti-FLAG	Abcam	ab21607	lapin	Lait 5%	1/5000 ^{ème}	55 kDa
Anti- β -actine	Sigma-Aldrich	A5060	lapin	Lait 5%	1/5000 ^{ème}	42 kDa
Anti-GAPDH	Chemicon	MAB374	souris	Lait 5%	1/10 000 ^{ème}	36 kDa

Tableau 1: Anticorps primaires utilisés pour les expériences de western-blot.

III.8. Incorporation de la protéine Elactiv' dans les fibres élastiques néo-synthétisées

Les NHDF ont étéensemencés sur des lamelles rondes en verre de 1,4 cm² de surface, préalablement déposées dans des plaques 24 puits standards (1,88 cm²/puits), à une densité de 2.10⁴ cellules.cm⁻² dans du milieu complet (DMEM F-12, SVF 10%, P/S 1%) (Life Technologies). Cinq jours post-confluence, la protéine Elactiv' a été ajoutée en solution dans le milieu de culture suivant une gamme de concentrations variant de 0 µg/ml à 2 µg/ml. Huit post-confluence, le milieu de culture a été aspiré et les puits ont été rincés trois fois avec du PBS avant d'être fixées au méthanol pur pendant 20 min à -20°C. Après 3 nouveaux rinçages au PBS, un traitement à la BSA 5% en PBS (p/v) pendant 1h à température ambiante a permis de saturer les sites aspécifiques. Les anticorps primaires : anti- α élastine (polyclonal, lapin, ab 21607, Abcam) dilué au 1/100^{ème} dans du PBS/BSA 0,5% (p/v), et anti-flag (monoclonal, souris, F3165, Sigma-Aldrich) dilué au 1/600^{ème} dans du PBS/BSA 0,5% (p/v), ont été incubés 2h à température ambiante en chambre humide. Après trois rinçages de 5 min au PBS, les anticorps secondaires ont été incubés 1h à température ambiante et à l'obscurité. L'anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'Alexa fluor 488 (Invitrogen[®] A11008) et l'anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa fluor 546 (Invitrogen[®] A11003) ont été dilués au 1/600^{ème} dans du PBS/BSA 0,5% (p/v).

Après cinq rinçages au PBS, les noyaux ont été contre-marqués au colorant de Hoechst (Sigma Aldrich) dilué à 1 µg/ml dans du PBS pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité.

Après cinq rinçages au PBS, les lamelles ont été montées en milieu aqueux avec une solution de Permafluor (LabVision, Thermo-scientifique). Les lamelles ont été séchées une nuit à l'air ambiant et à l'obscurité avant l'observation au microscope à épifluorescence Axioplan Imaging (Zeiss). La capture d'image a été réalisée par une caméra CCD Coolsnap fx (Photometrics) à l'aide du logiciel MetaVue (Universal Imaging Corporation).

IV. Caractérisation de la protéine Elactiv' comme support pour la culture 2D de kératinocytes humains

IV.1. Les kératinocytes primaires humains

Souche de kératinocytes primaires humains

La souche KER110011, utilisée dans cette étude, a été obtenue auprès de Biopredic (Rennes, France). Les kératinocytes, issus de la peau d'abdomen d'une femme caucasienne âgée de 32 ans, ont été reçus au passage 1 (P1), amplifiés au passage 2 et utilisés jusqu'au passage 4. Il a été vérifié qu'à ce passage, les cellules gardent leur potentiel prolifératif et n'entrent pas en sénescence.

Sous-culture des kératinocytes

Les kératinocytes primaires humains normaux (NHK : Normal Human Keratinocyte) ont été cultivés à 37°C sous une atmosphère saturée en eau et comprenant 5 % de CO₂, dans un milieu sans sérum qui présente une faible concentration en calcium (0,06 mM) (Keratinocyte Growth Medium 2, KGM2, Promocell). Ce milieu a été supplémenté avec de l'extrait d'hypophyse bovine (BPE : Bovine Pituitary Extract) à 0,004 ml.ml⁻¹, du facteur de croissance épidermique (EGF : Epidermal Growth Factor) à 0,125 ng.ml⁻¹, de l'insuline à 5 µg.ml⁻¹, de l'hydrocortisone 0,33 µg.ml⁻¹, de l'épinéphrine 0,32 µg.ml⁻¹, de la transferrine à 10 µg.ml⁻¹, de la pénicilline 100 U.ml⁻¹ et de la streptomycine à 100 µg.ml⁻¹ (Sigma-Aldrich).

Le milieu de culture (milieu complet) a été changé tous les 2 jours. Afin de garder leur potentiel prolifératif, les cellules ont été détachées lorsqu'elles atteignaient 70% de confluence. Si cette limite est dépassée, les cellules commencent à se différencier. Pour le détachement, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS stérile (Gibco, Life technologies) avant l'ajout d'une solution de trypsine-EDTA (trypsine 0,05% p/v -EDTA 0,02% p/v, Sigma-Aldrich).

Les kératinocytes ont été cultivés dans un milieu sans sérum, l'action de la trypsine-EDTA a été neutralisée par l'ajout d'un volume équivalent d'inhibiteur de trypsine (Soybean Trypsin inhibitor, Sigma-Aldrich) à 1 mg/ml dans du PBS. Les cellules décollées ont été centrifugées 5 min à 200g, puis remises en suspension dans le milieu de culture. 10 µl de suspension cellulaire ont été dilués dans une solution de bleu trypan 0,4% (Sigma-Aldrich) (dilution au ½) pour identifier les cellules mortes, et comptées à l'aide d'une cellule de Malassez.

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de pétri de 100 x 20 mm Optilux Dish (BD Biosciences Labware, Brumath, France) à une densité minimale de 4000 cellules.cm⁻² pour la sous-culture.

IV.2. Etude du potentiel progéniteur des kératinocytes (*Colony Forming Efficiency*)

500 NHK ont étéensemencés en triplicats sur des plaques 6 puits standards (9,40 cm²/puits) et cultivés pendant 12 jours dans du milieu KGM2 complet. Après 12 jours de culture, les cellules ont été fixées avec du glutaraldéhyde 6% (en PBS) pendant 5 min et colorées au Crystal violet 0,1% p/v (eau) pendant 30 min. Le nombre et la taille des colonies a été évalué selon la méthode de Stachelscheid (Stachelscheid, Ibrahim *et al.* 2008) qui classe les colonies en trois catégories : petites (<1 mm²), moyennes (1-2 mm²) et grandes colonies (>2 mm²), grâce au logiciel Image J[®]. Ce protocole a également été utilisé, dans un même objectif, avec les DGL (G2-G4).

IV.3. Etude de la différenciation précoce des kératinocytes

Le modèle de différenciation précoce consiste à induire les premières étapes de la différenciation en cultivant les kératinocytes à confluence dans un milieu sans facteurs de croissances exogènes, correspondant à du milieu KGM2 non supplémenté (KGM2 NS). Les premières étapes de la différenciation des kératinocytes sont suivies en analysant l'expression des ARNm des marqueurs spécifiques de différenciation au moment de la confluence (J0) puis 1 (J1), 2 (J2), 4 (J4) jours après la confluence.

La condition « 70 % de confluence », qui correspond à un état prolifératif des cellules, a été ajoutée en tant que contrôle négatif. Pour cela, 4.10⁴ cellules ont étéensemencées sur des plaques 12 puits standards (3,83 cm²/puits) et cultivées dans un milieu KGM2 complet. Lorsque les kératinocytes ont atteint la confluence, la différenciation a été induite par la culture en milieu KGM2 non supplémenté (contenant 0,06 mM Ca²⁺). Les niveaux d'expression des ARNm des marqueurs de différenciation ont été analysés par PCR en temps réel.

IV.4. Analyse de l'expression génique

IV.4.1. Extraction des ARN totaux

Après avoir lavé le tapis cellulaire au PBS, les cellules ont été lysées pour en extraire l'ARN total à l'aide du kit « RNeasy Mini » (Qiagen) selon les indications du fournisseur. Le principe du kit repose sur les propriétés de liaison sélective de la membrane de silice. Après lyse cellulaire et homogénéisation dans un tampon hautement dénaturant, contenant de la guanidine-thiocyanate (qui inactive immédiatement les RNases pour assurer la purification de l'ARN total), les ARN ont ensuite été retenus sur la membrane de silice de la colonne, essentiellement par des liaisons hydrogènes. L'éthanol 70% a permis de précipiter les ARN tout en procurant assez d'eau pour dissoudre les sels des tampons qui eux neutralisent les charges des ARN. Les contaminants, l'ADN et les protéines résiduelles, ont été éliminés par les lavages. L'éthanol du tampon a également permis d'éluer sélectivement l'ADN afin de n'obtenir que l'ARN. L'ARN total a été élué dans 30 µl d'eau sans RNase. L'eau a permis de réactiver la membrane de silice et de remplacer les liaisons hydrogènes silice-ARN par des liaisons hydrogène silice-eau. La concentration en ARN a été déterminée par dosage sur un spectrophotomètre (Nanodrop 2000, Thermo-scientifique). Le calcul du ratio des absorbances à 260 et 280 nm a permis d'évaluer la pureté des ARN et l'absence de protéines contaminantes. Un ratio 260/280 supérieur à 1,8 indique une pureté satisfaisante. Le ratio des absorbances 260/230 évalué, quant à lui, la contamination par les solvants.

IV.4.2. Transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée avec 1 µg d'ARN totaux grâce au kit Revert Aid First strand cDNA synthesis (Fermentas, Life Technologies). Après une étape de linéarisation des ARN de 5 min à 70°C, la transcription inverse a été réalisée à 42°C en présence d'oligonucléotides dT. L'ADN complémentaire (ADNc) a alors été synthétisé par la reverse transcriptase durant une heure.

La réaction a été stoppée par inactivation des enzymes 10 min à 70°C. Les ADNc ont alors été placés sur glace et dilués au 1/10^{ème} dans de l'eau, de façon à obtenir une concentration correspondant à 5 ng/µl d'ARN totaux initialement.

IV.4.3. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

IV.4.3.1. Principe

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en temps réel consiste à suivre l'amplification de l'ADN cible grâce à la détection du SYBR Green, un composé qui devient fluorescent lorsqu'il est intercalé dans de l'ADN double brin. La fluorescence détectée est directement corrélée à la quantité d'ADN néo-synthétisée. La réaction de PCR produisant à chaque cycle le double de molécules d'ADN, la quantité d'ADN présente au cycle C_t (N_{Ct}) est théoriquement proportionnelle à la quantité initiale de matrice cible (N_0) selon la formule $N_{Ct} = N_0 \times 2^{Ct}$.

IV.4.3.2. Amorces pour la PCR en temps réel

Les amorces utilisées pour les expériences de PCR en temps réel, dans l'étude de la différenciation précoce des kératinocytes en présence d'Elactiv', sont listées dans le tableau suivant (**Tableau 2**):

	gènes humains	Référence séquence	Amorce	Séquence amorce (5'→3')	Taille amplicon (pb)
gènes de référence	36BA	NM_001002.3 (variant1)/ NM_053275.3 (variant2)	F:	ATTGAAATCCTGAGTGATGTG	144
			R:	GTAGATGCTGCCATTGTC	
	RPL13A	NM_012423.2	F:	GATGGTGGTTCTCTGTCGCC	140
			R:	GGCTTTCCTTTCTCTTCTCCTCC	
Marqueur de prolifération kératinocytes	Ki67	NM_002417.3	F:	GCACACTCCACCTGTCCTGA	70
			R:	ACCTGACTCTGTTCCTGATG	
Marqueur de différenciation kératinocytes	K10	NM_000421.3	F:	GTGGAGGCTGACATCAACGG	168
			R:	CATTACATCACCAGTGACACA	
	IVL	NM_005547.2	F:	AGCAGCAGAAGCAGGAGGTG	125
			R:	AGCGGACCCGAAATAAGTGGAG	
	TGM1	NM_000359.2	F:	GCTACCTACGCACGGGATATTC	181
			R:	CAGGGGCTTCATGTTCTCGT	

Tableau 2: Séquences des amorces utilisées, pour la PCR en temps réel, dans l'étude de la différenciation précoce des kératinocytes primaires humains en présence d'Elactiv'.

IV.4.3.3. Protocole

La réaction de PCR temps réel a été réalisée grâce au Rotor-Gene Q (Qiagen). 25ng d'ADNc ont été amplifiés en utilisant le kit FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche) (contenant la Taq Polymerase, le SYBR Green et les dNTP), et les amorces sens et antisens à une concentration de 300 nM final.

Le programme de PCR en temps réel a été le suivant : 10 min à 95°C (activation de la Taq Polymérase suivie de 40 cycles de : 10 s à 95°C (dénaturation) et 30 s à 60°C (élongation/hybridation) et acquisition du signal à la fin de chaque étape d'hybridation/élongation. Le dernier cycle se prolonge 1 min à 60°C. Avant l'acquisition de la courbe de fusion, les échantillons ont été dénaturés 1 min à 95 ° C et ré-hybridés 1min à 55 ° C. Pour l'acquisition des courbes de fusion, les échantillons ont été chauffés de 55°C à 95°C avec une incrémentation de 1°C à chaque nouveau cycle et un temps d'équilibration de 10 sec à chaque cycle.

IV.4.3.4. Quantification relative

La méthode de quantification relative fait intervenir un gène de référence (plus communément appelé « gène de ménage ») qui va servir de normalisateur, ici le gène *36B4* (codant pour la protéine ribosomale RPLP0). Les résultats ont été exprimés par le rapport gène cible/gène de référence de chaque échantillon, lequel a été normalisé sur le rapport cible/référence d'un échantillon calibrateur (condition Témoin non traité et/ou T0 confluence, selon indication en légende de figure). La normalisation par l'échantillon calibrateur a permis de comparer le niveau d'expression relatif des différents échantillons entre eux. L'efficacité d'amplification de la PCR étant considéré de 2, la formule de calcul du ratio R d'expression du gène cible d'un échantillon par rapport au calibrateur est $R = 2^{\Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ calibrateur}}$, $R = 2^{(Ct \text{ cible calib-} Ct \text{ cible éch}) - (Ct \text{ ref calib-} Ct \text{ ref éch})}$, d'où l'appellation de cette méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001).

V. Application de la protéine Elactiv' dans le syndrome de Williams-Beuren

V. 1. Les souches de fibroblastes des patients Williams-Beuren

N° souche	Type cellulaire	Sexe du donneur	Phénotype	Age du donneur	Contrôle apparié
G371	fibroblaste	M	WBS	8 ans	P068
P068	fibroblaste	M	Sain	8 ans	-

Tableau 3: Souches des fibroblastes primaires utilisées pour l'étude de la pathologie Williams-Beuren (WB). Ces cellules sont issues du centre de Biotechnologie et de Cytogénétique de Lyon. Le patient atteint du syndrome de Williams-Beuren a été analysé en regard de son contrôle apparié, c'est-à-dire provenant de la même zone de prélèvement, du même âge et du même sexe que le patient.

Les cellules de patients de WB sont cultivées suivant le même protocole que celui des fibroblastes sains, détaillé dans le paragraphe III.1 « les fibroblastes dermiques humains ».

V. 2. Induction d'un dépôt fibrillaire de tropoélastine dans les cellules Williams-Beuren

Les cellules WB (souche G371) et leur contrôle apparié (souche P068) ont étéensemencées sur des lamelles rondes en verre de 1,4 cm² de surface, préalablement déposées dans des plaques 24 puits standards, à une densité de 2.10⁴ cellules.cm⁻² dans du milieu complet (DMEM F-12, SVF (Sérum de Veau Fœtal) 10%, P/S 1%) (Life Technologies). A confluence ou cinq jours post-confluence, la protéine Elactiv' a été ajoutée en solution dans le milieu de culture suivant une gamme de concentrations variant de 0 µg/ml à 2 µg/ml. Huit ou dix-sept jours post-confluence, le milieu de culture a été aspiré et les puits ont été rincés trois fois avec du PBS. Les cellules WB ont été fixées dans du méthanol pur pendant 20 min à -20°C. La suite du protocole suit le même que celui détaillé dans le paragraphe III.8 « Incorporation Elactiv' dans les fibres élastiques néo-synthétisées ».

V. 3. Profil d'expression génique des cellules Williams-Beuren traitées avec Elactiv'

Les cellules WB (souche G371) ont étéensemencées à une densité de 2.10^4 cellules.cm⁻² dans du milieu complet (DMEM F-12, SVF 10%, P/S 1%). Les cellules ont été mises au repos dans du milieu sans sérum 16h avant le début de l'expérience, afin d'éliminer les facteurs de croissance. Une fois la confluence atteinte, la protéine Elactiv' et le peptide VGVAPG (Genscript) utilisé en contrôle positif, ont été ajoutés dans le milieu de culture des cellules WB à une concentration de 2 µg/ml, \pm 10 mM de L-lactose (Euromedex). Les cellules ont été cultivées pendant 24h et 48h avant l'extraction et l'analyse de l'expression relative des ARNm par PCR en temps réel (principes et protocoles détaillés dans le paragraphe IV.4 « analyse de l'expression génique »). Les séquences des amorces utilisées pour la PCR en temps réel, au cours de cette étude sont répertoriées dans le **tableau 4** :

	gènes humains	Référence séquence	Amorce	Séquence amorce (5'→3')	Taille amplicon (pb)
gènes de référence	36BA	NM_001002.3 (variant1)/ NM_053275.3 (variant2)	F:	ATTGAAATCCTGAGTGATGTG	144
			R:	GTAGATGCTGCCATTGTC	
	RPL13A	NM_012423.2	F:	GATGGTGGTTCCTGCTGCCC	140
			R:	GGCTTCTCTTTCCTCTTCTCCT CC	
Gènes de la matrice extracellulaire	ELN	NM_000501.2	F:	GTGGTGGCTTAGGAGTGCTG	74
			R:	CGGCACCTTCCCAGGCTTC	
	FBLN5	NM_006329.3	F:	CGGCACATACTTCTGCTCCTG	82
			R:	GCTCACATTCGTTGATGTCTTGG	
	FBN1	NM_000138.4	F:	CTGCCCACCTGATTTGAAGT	60
			R:	CCAGAGCGGGTATCAACACAG	
	LOX	NM_002317	F:	GGATACGGCACTGGCTACTTC	243
			R:	TTGGTCGGCTGGGTAAGAAAT	
	LOX-L1	NM_005576.2	F:	GCACCTCTCATAACCCAGGGC	66
			R:	TGGCAGTCGATGTCCGCAT	
	MMP-1	NM_002421.3	F:	GCTTTCCTCCACTGCTGCT	144
			R:	CTTGCTCCCATCATCTTC	
	FBN2	NM_001999.3	F:	AATCCTAGCACAGCCAGTCTGC	84
			R:	AACCACGGTTGCCTTTGAGC	

Tableau 4: Séquences des amorces utilisées, pour la PCR en temps réel, dans l'étude du profil d'expression génique des cellules WB traitées avec la protéine Elactiv'.

VI. Hydrogel Elactiv'

VI.1. Conception de l'hydrogel Elactiv' réticulé par la génipine

Une solution d'Elactiv' pure ($V_f = 200 \mu\text{l}$) a été préparée à une concentration finale de 50 mg/ml dans du PBS (150 mM NaCl, pH 7,4). Après homogénéisation, la solution a été chauffée pendant 10 min à 42°C afin d'induire la coacervation. Une fois coacervée, la solution a été centrifugée à 300g pendant 10 min à 42°C dans un microtube de 1,5 ml à fond plat (8 mm de diamètre) à une hauteur de 1 mm. Le surnageant a été éliminé. Afin d'induire la réticulation, le culot d'Elactiv' a été recouvert de 200 μl d'une solution aqueuse de génipine (Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 50 mM, toute une nuit à 42°C. Le lendemain, le gel a été enlevé du microtube, hydraté dans du PBS, pH 7,4 et stocké à 4°C.

VI.2. Tests mécaniques de micro-indentation

Pour étudier les propriétés élastiques de l'hydrogel Elactiv' (réticulé par de la génipine), telles que le module d'élasticité et l'énergie restituée par cycle, des tests d'indentation ont été effectués sur hydrogel en immersion totale dans du tampon physiologique.

VI.2.1. Principe

L'essai d'indentation est semblable à un essai de compression. Ce test consiste à enfoncer un indenteur rigide (ou poinçon) normalement à la surface du matériau, suivant un cycle de charge-décharge jusqu'à atteindre la consigne en effort. Cette technique permet de mesurer la variation de la force normale appliquée F_N en fonction de la profondeur de pénétration dans le matériau. Dans la présente étude, les tests d'indentation ont été effectués en mode effort imposé. Le déplacement-z a été obtenu à partir d'une table de déplacement (National Instrument) contrôlée par un capteur de déplacement (Ecole Centrale de Lyon, France) (**Figure 40**). Le dispositif expérimental offre une large gamme de vitesses d'indentation de 1 à 100 $\mu\text{m.s}^{-1}$.

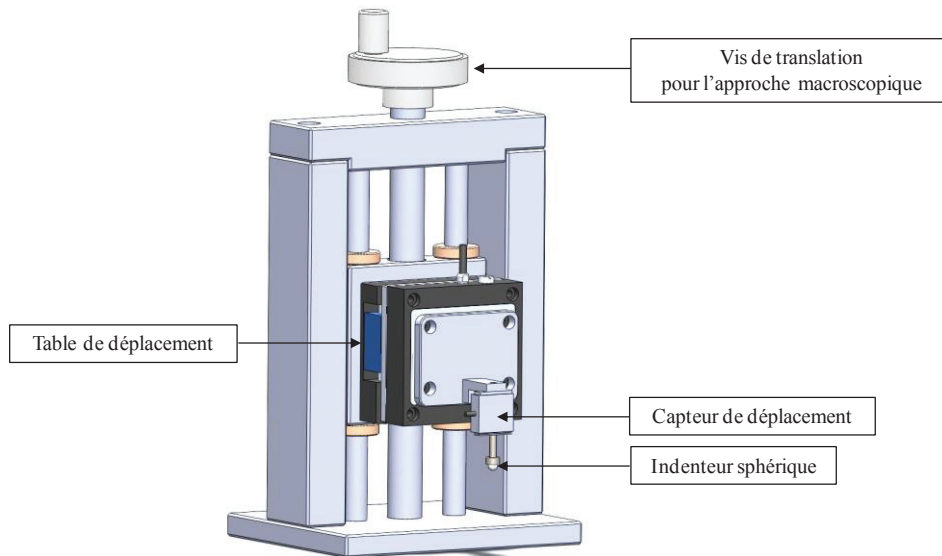


Figure 40: Représentation schématique du dispositif expérimental de micro-indentation (adaptée de Pailler-Mattei, Laquieze *et al.* 2014).

La force normale est reliée à l'enfoncement selon une loi de puissance du type $\text{Force}_{\text{Normale}} = c \cdot \text{déplacement}^n$. La constante c et l'exposant n dépendent de la géométrie de l'indenteur et du comportement du matériau. Dans le cas d'un matériau élastique, la courbe de charge et la courbe de décharge sont confondues. En revanche, pour un matériau viscoélastique, une boucle d'hystérésis est observée entre la courbe de charge et celle de décharge. Cette boucle est liée au caractère dissipatif du matériau viscoélastique (**Figure 41**).

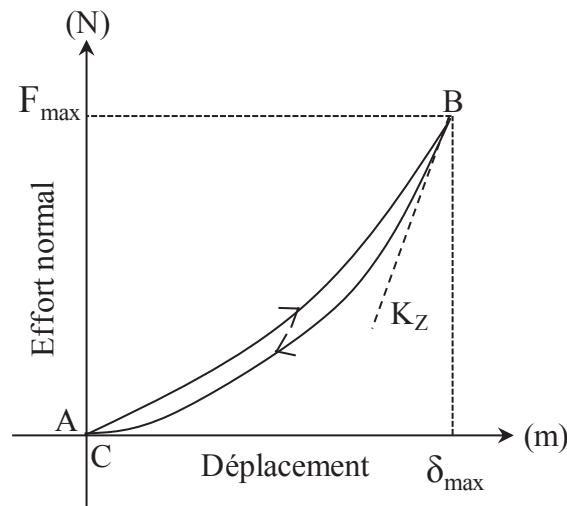


Figure 41: Courbe d'indentation obtenue avec un matériau viscoélastique. Le point A indique le début du contact mécanique entre l'indenteur et le matériau. La courbe de charge AB et celle de décharge BC reflètent le comportement mécanique du matériau. Le point B correspond au maximum de charge ($F_{N\max}$) pour l'enfoncement maximum (δ_{\max}). K_Z représente la raideur de contact.

A partir de la courbe de décharge, est calculée la raideur de contact indenteur/matériau, puis à partir de la valeur de la raideur de contact, le module d'élasticité du matériau est déterminé. La raideur de contact K_Z correspond à la tangente de la pente au premier point de décharge (Sneddon 1965).

$$K_Z = \left. \frac{dF}{d\delta} \right|_{F=F_{\max}}$$

où F (exprimé en Newton) est la force normale et, δ (exprimé en mètre) le déplacement de l'indenteur.

Grâce à la raideur de contact, le module d'élasticité réduit E^* ou module de Young (exprimé en Pascal) est déterminé à partir de la relation suivante :

$$E^* = \frac{K_Z}{2a}$$

Avec a le rayon de contact indenteur/matériau défini à partir de la relation de Hertz (Hertz 1882) (**Figure 42**) :

$$a = \sqrt{\frac{3F \cdot R}{2K_Z}}$$

où F est la force normale, K_Z la raideur de contact et R le rayon de l'indenteur.

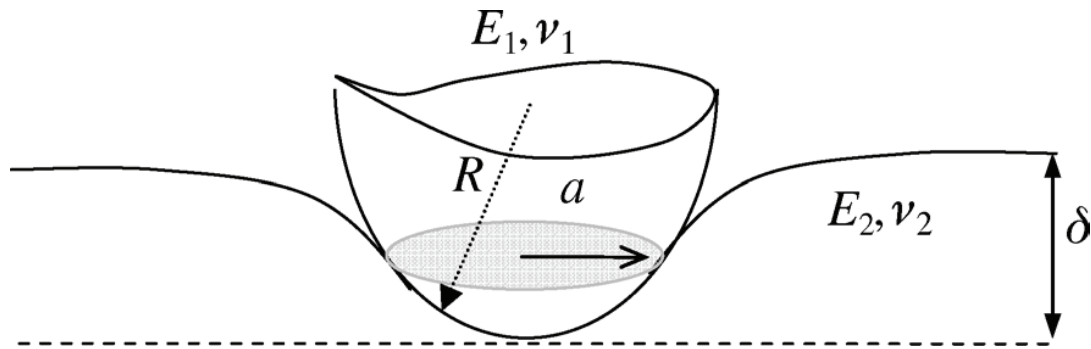


Figure 42: Contact élastique entre un échantillon souple et un indenteur sphérique indéformable, où R est le rayon de courbure de l'indenteur sphérique, a est le rayon de contact, δ la profondeur de pénétration, E_1, ν_1 et E_2, ν_2 étant respectivement les modules d'Young et les coefficients de Poisson de l'indenteur et du matériau.

Le module d'Young réduit est égal à :

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2}$$

Avec ν_1, E_1 et ν_2, E_2 étant respectivement les coefficient de Poisson et les module d'Young de l'indenteur et du matériau. Si $E_1 \gg E_2$, nous pouvons considérer que E^* est le module d'Young réduit apparent du matériau. D'où:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu_2^2}{E_2}$$

L'analyse énergétique de la courbe d'indentation permet d'estimer le rapport de l'énergie restituée par le matériau au cours de la phase de décharge (aire sous la courbe de décharge) sur l'énergie fournie au matériau au cours de la phase de charge (aire sous la courbe de charge) (**Figure 43**). Le rapport de l'énergie restituée par le matériau est noté ψ et utilise l'intégration pour calculer la surface de l'espace délimité par la représentation graphique de la fonction $F(z) dz$:

$$\psi = \frac{\int_{z_{\max}}^0 F_z | \text{décharge} dz}{\int_0^{z_{\max}} F_z | \text{charge} dz} \times 100$$

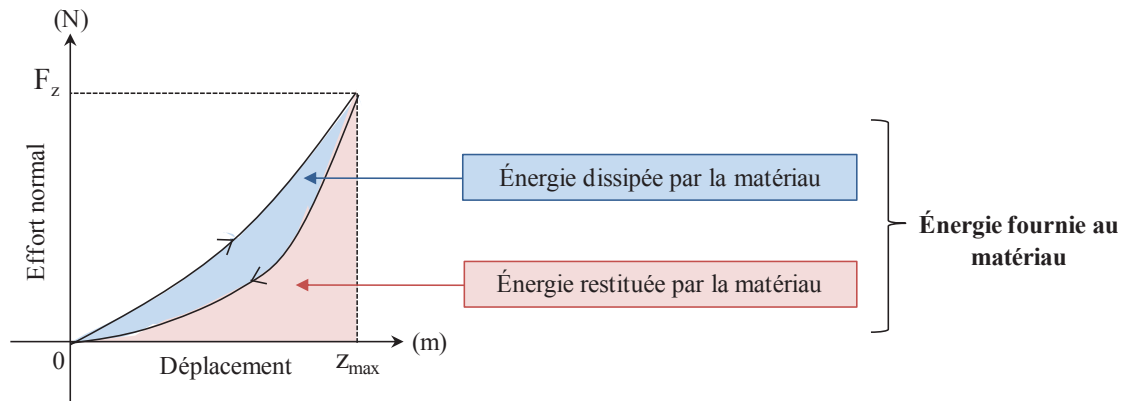


Figure 43: Analyse énergétique de la courbe d'indentation. L'aire sous la courbe de charge représente l'énergie fournie au matériau alors que l'aire sous la courbe de décharge représente l'énergie restituée par le matériau. L'aire comprise entre la courbe de charge et celle de décharge représente l'énergie dissipée, caractéristique d'un matériau viscoélastique.

VI.2.2. Protocole

Dans cette étude, la force normale appliquée a été $F_N = 2$ ou 4 mN pour une vitesse d'indentation constante $V = 20 \mu\text{m.s}^{-1}$. Un indenteur sphérique en acier a été utilisé, avec un rayon de courbure $R = 1,6$ mm. Aucun temps de pause n'a été appliqué entre la charge et la décharge, et un seul cycle de charge a été effectué pour chaque test. Les tests d'indentation ont été répétés cinq fois en des points différents de l'hydrogel Elactiv'-génipine, préalablement déposé dans un cristalliseur en verre rempli de sérum physiologique. Les tests d'indentation ont été effectués en immersion totale dans le sérum physiologique afin d'éviter ou de minimiser l'effet d'adhérence dû à des phénomènes capillaires entre l'échantillon et l'indenteur. Grâce à un système d'acquisition LabVIEW (National Instruments, TX, USA) les courbes d'indentation ont été enregistrées en temps réel. Les essais d'indentation ont été réalisés à faibles charges donc non destructif vis-à-vis de l'échantillon.

VI.3. Viabilité des fibroblastes cultivés sur l'hydrogel Elactiv': test Live/Dead

Les NHDF ont étéensemencés à une densité de $10\,000 \text{ cellules.cm}^{-2}$ dans $10 \mu\text{l}$ de milieu complet (DMEM F-12, SVF 10%, P/S 0,1) (Life technologies) sur les hydrogels Elactiv' préalablement déposés dans des plaques 12 puits. 2h après l'ensemencement, 1 ml de milieu complet a été ajouté dans chacun des puits dans le but de recouvrir les hydrogels. Le lendemain puis 2, 4 et 13 jours après l'ensemencement des cellules, la viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du kit Live/Dead cell double staining (Sigma-Aldrich). Ce kit permet le marquage fluorescent des cellules viables et mortes à la calcéine-AM et à l'iodure de propidium respectivement. Bien que la calcéine-AM soit une molécule non-fluorescente, la calcéine générée à partir de la calcéine-AM par une estérase dans les cellules viables émet une forte fluorescence verte ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$). En revanche, l'iodure de propidium n'est pas capable de passer à travers les membranes des cellules viables. Il atteint le noyau, en passant par les zones désordonnées des membranes des cellules mortes, et s'intercale dans la double hélice d'ADN. La calcéine et l'iodure de propidium peuvent être excités simultanément à 490 nm et la surveillance simultanée des cellules viables et mortes a été possible avec un microscope à fluorescence inversée (Nikon TE300, Champigny-sur-Marne, France). La capture d'image a été réalisée par une caméra CCD Coolsnap fx (Photometrics) à l'aide du logiciel MetaVue (Universal Imaging Corporation).

VI.4. Implantation des hydrogels Elactiv' en sous-cutanée chez la souris

Dans le but d'étudier *in vivo* la biocompatibilité et la dégradation de l'hydrogel Elactiv', ce dernier a été implanté en sous-cutané chez la souris. Des analyses histologiques (coloration standard HES: Hématéine/Eosine/Safran) ont permis d'évaluer la colonisation de l'hydrogel par les cellules murines mais également la vascularisation, la dégradation du biomatériau et la réaction inflammatoire.

VI.4.1. Modèle animal

Les souris mâles utilisées dans cette étude étaient de la souche C56Bl6/JRJ fournie par Janvier (Saint Genest Saint Isle, France) et étaient âgées de sept semaines. A l'arrivée dans le laboratoire, les souris ont été soumises à une période d'acclimatation d'une semaine à l'animalerie respectant le cycle jour/nuit 12h/12h. Les animaux ont été placés dans des cages individuelles ayant accès *ad libitum* à la nourriture et à de l'eau potable fraîche. Les souris ont été nourries avec des croquettes standards et l'eau de boisson a été changée deux fois par semaine.

VI.4.2. Préparation de l'animal

48h avant l'implantation des hydrogels, la souris a été rasée puis dépilée à l'aide d'une crème Veet® (Reckitt Benckiser, Massy, France) au niveau du dos laissant une zone dépourvue de poils. Le jour de l'expérimentation, la peau du dos de la souris a été désinfectée à la Bétadine® scrub 4% (rouge).

VI.4.3. Préparation des hydrogels Elactiv'

Les hydrogels Elactiv' (50 mg/ml) réticulés par de la génipine (50 mM) ont été préparés suivant le protocole détaillé dans le paragraphe VI.1 « Conception de l'hydrogel Elactiv' réticulé par la génipine ». Pour limiter les effets pyrogéniques et inflammatoires du matériau chez la souris, les endotoxines ont été éliminées des hydrogels en les lavant successivement, quatre fois 1 h, dans une solution d'éthanol 100%, chauffée à 100°C, par l'intermédiaire d'un système de reflux. Les hydrogels ont ensuite été stérilisés une nuit dans de l'éthanol à 70% ; cette étape a également permis d'augmenter le caractère hydrophile de l'hydrogel, rendu très hydrophobe par la protéine Elactiv'. Les hydrogels ont été rincés puis stockés dans du PBS avant leur utilisation.

VI.4.4. Expérimentation

L'implantation des hydrogels a été effectuée sous anesthésie générale par isoflurane (induction de l'anesthésie à 4 %, maintien à 1 % ; 2 L/min). Quatre incisions transversales de la peau ont été pratiquées, deux dans la partie supérieure du dos et deux dans la partie inférieure du dos, de part et d'autre de la colonne vertébrale de l'animal. L'hydrogel, préalablement stérilisé, a été inséré en sous-cutané entre la peau et les muscles sous-jacents, à 1 cm environ de la zone d'incision, dans une poche créée artificiellement lors de la séparation du tissu conjonctif du tissu cutané, évitant toute déviation de la position de l'hydrogel au cours du temps (**Figure 44**). Une suture de polyfon (Ethicon, Issy Les Moulineaux, France) a permis de refermer les incisions. Quatre semaines après l'implantation des hydrogels Elactiv', la souris a été anesthésiée par une injection intrapéritonéale de 150 μ l d'un thiopental (Nesdonal, Merial, Lyon, France) à 50 mg/ml (dans du sérum physiologique). Dans un sommeil profond, la souris a ensuite été euthanasiée par une injection intracardiaque d'une dose létale d'anesthésique (entre 200 μ l et 500 μ l de Nesdonal à 50 mg/ml), dans le but de prélever par la suite le tissu cutané.

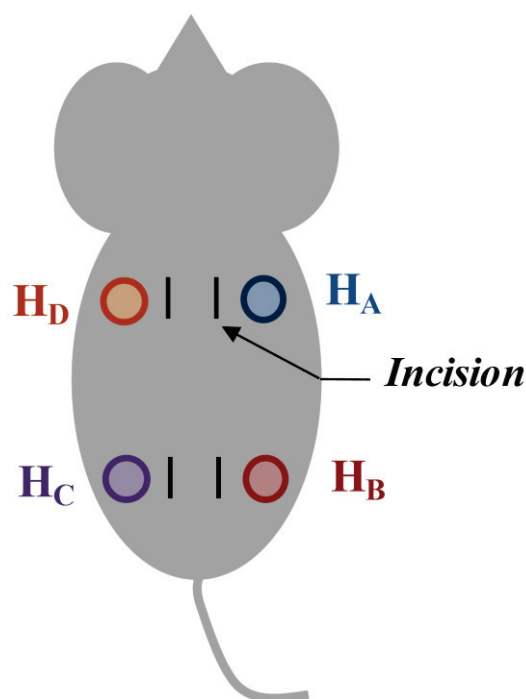


Figure 44: Schéma d'implantation des hydrogels Elactiv' (HA - HD) en sous-cutanée chez la souris.

VI.5. Techniques d'histologie

VI.5.1. Préparation des échantillons inclus en paraffine

Les échantillons de peau de souris, contenant l'hydrogel Elactiv' (visualisé facilement par sa coloration bleue), ont été placés entre deux mousses dans des cassettes d'inclusion avant d'être fixés dans une solution d'AFA (Fixative AFA liquid, Carlo Erba, Val-de-Reuil, France) pendant 24h à température ambiante. La fixation protège la structure tissulaire et maintient les échantillons à plat pour faciliter leur inclusion orientée en paraffine.

Après 24h, les échantillons ont été déshydratés et inclus en paraffine dans un automate (HMP110, Micron) selon le protocole suivant : un bain de 1h en éthanol 100%, cinq bains de 1h en acétone, trois bains de 1h en xylène, puis deux bains de 1h30 en paraffine à 60°C. Le bloc de paraffine a ensuite été refroidi au minimum 1h à -20°C avant son utilisation. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome sur des lames silanisées, préalablement traitées par une solution d'albumine glycinée. Les lames ont été placées 5 min à 37°C afin de faciliter l'étalement et l'adhérence des coupes. Les lames ont ensuite été égouttées en enlevant l'excédent d'albumine glycinée, puis séchées une nuit à 37°C avant la coloration Hématoxyline-Eosine-Safran.

VI.5.2. Coloration histologique à l'Hématoxyline-Eosine-Safran

La coloration Hématoxyline-Eosine, réalisée par l'entreprise Novotec (Lyon, France) a permis d'observer la structure et la morphologie du tissu. L'Hématoxyline de Harris est un colorant basique qui colore la chromatine à l'intérieur des noyaux en violet. L'Eosine G et le safran colorent les éléments matriciels en jaune-rosé et le cytoplasme en rose. Avant la coloration, les coupes ont été déparaffinées et progressivement réhydratées selon le protocole suivant : 2 x 3 min en Méthylcyclohexane, 3 min en Ethanol 100 %, 3 min en Ethanol 75 %, 5 min en Ethanol 50 %, 3 x 5 min en eau déminéralisée. La coloration à l'Hématoxyline a été réalisée par un bain de 2 min dans le colorant pur, suivi d'un rinçage de 4 min à l'eau courante. La coloration à l'Eosine a été réalisée par un bain de 5 min dans le colorant pur, suivi d'un rinçage de 4 min à l'eau courante. Les lames ont ensuite été déshydratées par des bains successifs d'Ethanol 75 %, Ethanol 100 % et Méthylcyclohexane (3 min/bain). Les coupes ont été montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage Mountex (Microm, Francheville, France) et laissées sécher une nuit à température ambiante.

VII. Les dendrigrafts de poly(L-lysine) : DGL

Il s'agit de polymères de structure sphérique constitués uniquement de résidus de lysines et qui se développent de manière arborescente (**Figure 45**). Ces composés sont très solubles dans l'eau et présentent une haute densité de fonctions -NH_2 en surface qui sont protonées formant des poly-cations en solvant aqueux (en milieu neutre ou acide) (Collet, Souaid *et al.* 2010). Ces DGLs présentent une grande capacité et flexibilité de greffage, une résistance à la stérilisation ainsi qu'une bonne biocompatibilité. Ces DGLs peuvent aussi représenter des molécules cages avec un volume libre interne de l'ordre de 80% capable de piéger différents composés en son sein. Plusieurs études ont déjà mis en évidence des avantages au niveau biologique comme leur furtivité au niveau du système immunitaire (Romestand, Rolland *et al.* 2010). Ils peuvent aussi passer la barrière hémato-encéphalique suite à des modifications chimiques comme le greffage d'une molécule d'adressage (la leptine) (Liu, Guo *et al.* 2013). Enfin, intégrés au sein d'un système multicouche dans le cadre de la reconstruction dentaire, ils potentialisent le système en le rôle de réservoir pour les molécules d'intérêt (Fioretti, Mendoza-Palomares *et al.* 2010). Ces différentes caractéristiques font des DGLs des candidats prometteurs en ingénierie tissulaire.

Génération	G1	G2	G3	G4	G5
Structure	Linéaire	DGL	DGL	DGL	DGL
Masse molaire moyenne en nombre (g/mol)	1 450	8 600	22 000	65 300	172 300
Diamètre à pH 7 (nm)	2	4,5	7	11	16
Nombre de motifs lysines	8	48	123	365	963
Polydispersité	1,2	1,38	1,46	1,36	1,45
Taux de branchement	100%	81%	80%	65%	64%
Volume libre (%)	0,721	0,766	0,804	0,825	0,791

G1
8 lysines – 2 nm

G2
48 lysines – 4,5 nm

G3
123 lysines – 7 nm

G4
365 lysines – 11nm

G5...

Figure 45: Caractéristiques et illustration de la structure arborescente des dendrigrafts de poly(L-lysine) au cours des générations successives (Données fournies par COLCOM).

VII.1. Caractérisation des surfaces greffées de DGL par microscopie à force atomique

VII.1.1. Principe

La Microscopie à Force Atomique (AFM pour *Atomic Force Microscopy* en anglais) est une technique permettant de visualiser avec une résolution nanométrique la morphologie tridimensionnelle de la surface de tous types d'échantillons (métaux, polymères, échantillons biologiques) de différentes formes (films, fibres, poudres), à l'air, en atmosphère contrôlée ou en milieu liquide. Le principe de l'AFM consiste à mesurer les différentes forces d'interaction entre une pointe idéalement atomique fixée à l'extrémité d'un bras de levier, et les atomes de la surface d'un matériau (forces de répulsion ionique, forces de van der Waals, forces électrostatiques, forces de friction, forces magnétiques...). La déflexion du levier est suivie en positionnant un faisceau laser sur la face supérieure du levier, le faisceau est réfléchi sur un miroir puis tombe sur des photodétecteurs qui enregistrent le signal lumineux. Les déplacements x,y,z se font grâce à une céramique piézo-électrique (**Figure 46**). Le balayage en x,y peut aller de quelques nanomètres à 140 μm . La sensibilité en z étant de la fraction de nanomètre et le déplacement en z peut aller jusqu'à 3,7 μm .

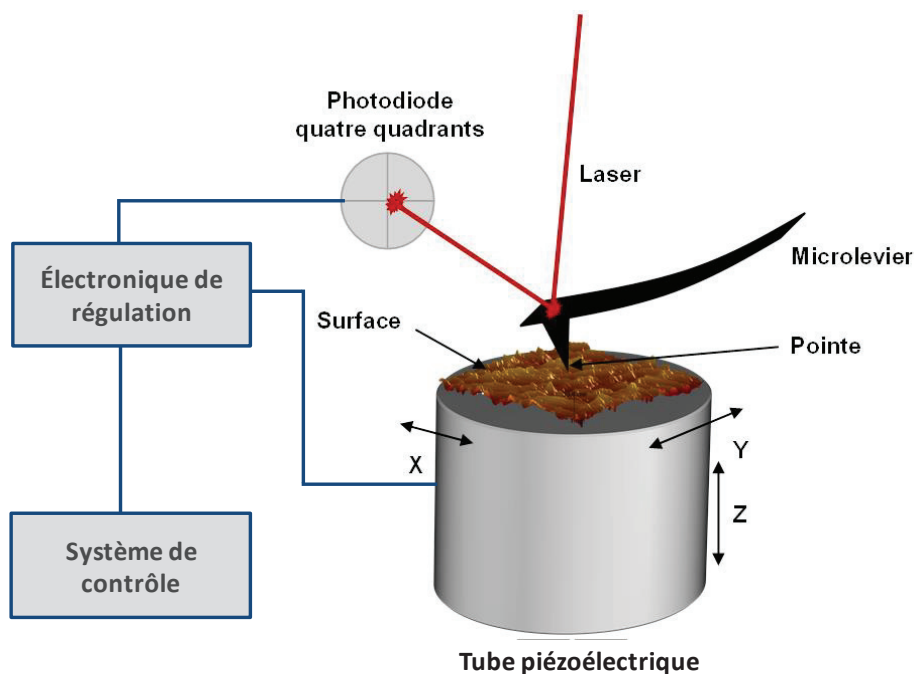


Figure 46 : Schéma de principe du microscope à force atomique fonctionnant en mode « tapping » (<http://www.biophyresearch.com>).

L'utilisation de l'AFM en mode contact permet d'obtenir la meilleure résolution, mais les forces adhésives (forces de capillarité et électrostatiques surtout) et les forces de friction augmentent la force totale, pouvant endommager la pointe et l'échantillon (en particulier les échantillons biologiques). Ces inconvénients peuvent être évités en travaillant en milieu liquide où les forces de capillarité sont alors supprimées, mais il existe toujours l'influence des forces de friction. Pour pallier à cet inconvénient, des modes résonants ont été développés dont le mode « tapping » utilisé dans notre étude.

L'AFM en mode « tapping » consiste à faire osciller le levier, en surface de l'échantillon, près de sa fréquence de résonance, à une amplitude suffisamment élevée de façon à ce que la pointe traverse la couche de contamination habituellement présente sur toute surface analysée. Lorsque la pointe interagit avec la surface de l'échantillon, l'amplitude décroît (car la fréquence de résonance change). La variation de l'amplitude d'oscillation est utilisée comme signal d'asservissement afin de corriger le déplacement en z, pour conserver l'amplitude constante et ainsi suivre la morphologie de surface. La résolution est un peu moins bonne que dans le mode contact mais la résolution moléculaire peut tout de même parfois être obtenue.

VII.1.2. Protocole (réalisé par COLCOM)(Coussot, Faye *et al.* 2011)

Des DGL de plusieurs générations (G2 à G4), fournis par l'entreprise COLCOM (Clapiers, France), ont été greffés sur des lames en verre (lames époxydes Corning®, référence 40042) en utilisant la même chimie et le même protocole décrit plus loin dans le paragraphe VIII.1.2 « greffage covalent des DGL ». Les lames ont été rincées avec de l'eau déminéralisée puis séchées à l'air comprimé. Les résultats ont été obtenus par analyse de la surface en utilisant un microscope à force atomique digital, de dimension 3100 (Veeco Instrument) à l'air ambiant et à température ambiante en mode « tapping ». Une pointe classique (Nanocapteurs FM) avec un rayon de courbure de 5 nm a été utilisée pour ces expériences.

VII.2. Caractérisation des DGL comme support pour la culture 2D de fibroblastes dermiques humains

VII.2.1. Les fibroblastes dermiques humains

La souche FP220397, isolée à partir de prépuce néonatal d'un donneur sain, a été utilisée. Cette souche a été obtenue auprès de la Banque des Tissus et Cellules du laboratoire des Substituts Cutanés, du Centre de Ressources Biologiques (CRB) des Hospices Civils de Lyon. Les FP220397 ont été cultivés dans les mêmes conditions que les NHDF (décrites dans le paragraphe III.1.).

VII.2.2. Viabilité et prolifération des fibroblastes en présence des DGL: test Uptiblu[®]

Les FP220397 ont été ensemencés sur des plaques 96 puits à raison de $4 \cdot 10^3$ cellules.cm⁻² et incubés une nuit dans du milieu complet (DMEM F-12, SVF 10%, P/S 0,1%) (Life technologies) pour permettre l'adhérence des cellules.

Les tests de viabilité cellulaire ont été réalisés 24h après l'ensemencement des cellules, en phase homogène, en ajoutant de la Poly-L-Lysine linéaire (PLL) (Sigma-Aldrich), en contrôle positif, et les DGL (G2-G4) suivant une gamme de concentration variant de 1 à 50 µg/ml, dans le milieu de culture.

Les tests de prolifération cellulaire ont, quant à eux, été réalisés en phase hétérogène sur des surfaces greffées de PLL et DGL (G2-G4) suivant le protocole décrit plus loin dans le paragraphe VIII.1.2 « greffage covalent des DGL », avec en contrôle négatif la plaque brute.

La viabilité et la prolifération cellulaire ont été mesurées tous les deux jours pendant quatre jours, en ajoutant un indicateur fluorimétrique métabolique, l'Uptiblu[®] (Interchim, Montluçon, France), dans le milieu de culture. L'Uptiblu[®] est non toxique et stable pour les cellules, et se compose d'un indicateur d'oxydo-réduction qui produit un changement colorimétrique du milieu de culture (bleu à pourpre), et un signal fluorescent en réponse à l'activité métabolique cellulaire. Après 3h d'incubation en présence d'UptiBlue[®], les surnageants ont été récoltés, transférés dans une plaque 96 puits noire, et la fluorescence a été mesurée dans un lecteur microplaque Tecan Infinite[®] M1000PRO à 540 nm et 590 nm pour des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives.

VII.2.3. Etude de l'étalement et de l'adhérence des fibroblastes cultivés sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL (G2-G4)

VII.2.3.1. Etalement des fibroblastes sur les DGL : microscopie confocale

L'étalement des fibroblastes FP220397 a été évalué sur des lames en verre 8 puits (labtek, Merck, Millipore) fonctionnalisées avec des DGL-G3 ou de la PLL. 30 et 60 min après l'ensemencement, le milieu de culture a été aspiré et les puits ont été rincés doucement une fois avec du PBS. Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde 4% (v/v) (Sigma-Aldrich) pendant 20 min et rincées trois fois avec du PBS. Les noyaux cellulaires et les réseaux d'actine ont été marqués en utilisant respectivement le Hoechst (Sigma-Aldrich) et la phalloïdine-TRITC (Sigma-Aldrich à une concentration de 1 µg/ml dans du PBS pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. Après trois rinçages au PBS, les lamelles ont été montées en milieu aqueux avec une solution de Permafluor (LabVision, Thermo-scientifique). Les images ont été acquises avec le microscope confocale Olympus FV10i en utilisant l'objectif à immersion X60.

VII.2.3.2. Adhérence précoce des fibroblastes sur les DGL

Préparation de la plaque de culture

De la PLL (Sima-Aldrich), en contrôle positif, et les DGL (G2-G4) ont été adsorbés sur une plaque 96 puits (0,32 cm²/puits), à une concentration de 10 µg/ml dans du PBS. La plaque a été incubée 2h à température ambiante, puis lavée trois fois au PBS et séchée sous la hotte.

Protocole

Le test d'adhésion cellulaire utilisant la méthode au Percoll a été adaptée d'après Goodwin et Pauli (1995). Les cellules en culture ont été détachées par action d'une solution de trypsine/EDTA et transférées dans un tube contenant du milieu sans SVF avec un inhibiteur de la trypsine (Trypsin Soybean Inhibitor). Les cellules ont été centrifugées à 200 g pendant 5 min à 25°C puis resuspendues dans du milieu DMEM F-12 sans SVF à la densité de 3.10^5 cellules.ml⁻¹. La suspension cellulaire a été répartie dans une plaque 96 puits greffée avec les différents polymères (PLL et DGL G2-G4), à raison de 100 µl/puits. Le contrôle correspond à la plaque brute (sans greffage).

L'adhérence cellulaire dure 5 min, puis une solution de Percoll (1,10 g/l) a été ajoutée pour séparer les cellules non-adhérentes. Les cellules adhérentes ont ensuite été fixées avec une solution de Percoll plus dense (1,13 g/l) contenant 10 % de glutaraldéhyde. Les surnageants ont été éliminés et les cellules lavées trois fois avec du PBS. Enfin, les cellules ont été colorées avec du Crystal Violet. L'excédent de colorant a été éliminé et le colorant, piégé dans les cellules, a été dissout par une solution de SDS 2 % p/v. L'absorbance a été lue à 570 nm avec un lecteur de microplaque (Infinite M1000, Tecan).

VII.2.3.3. Adhérence tardive des fibroblastes sur les DGL

Après avoir observé une augmentation de l'adhérence précoce des fibroblastes, en présence des DGL, les cultures ont été prolongées pour mettre en évidence un système d'adhérence active par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, une des intégrines majoritaires dans le fibroblaste dermique.

Préparation de la plaque de culture

De la PLL (Sigma-Aldrich), en contrôle positif, de la BSA (Euromedex) en contrôle négatif, et les DGL (G2-G4) ont été adsorbés sur une plaque 6 puits (9,6 cm²/puits), à une concentration de 10 µg/ml dans du PBS. La plaque a été incubée 2h à 4°C, puis lavée trois fois au PBS et séchée sous la hotte.

Protocole

Les fibroblastes FP220397 ont étéensemencés à une densité de 3.10^4 cellules.cm⁻² dans du DMEM F-12, SVF 2%, P/S 1% sur les plaques 6 puits au fond desquelles ont adhéré les polymères. Les cellules ont été laissées 72h en culture avant l'extraction des protéines totales et l'analyse protéique de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ par western-blot, dont le protocole est décrit dans le paragraphe III.7 « Analyse protéique à partir de fibroblastes en western-blot ».

VIII. Etude de l'assemblage de l'unité hybride

VIII.1. Test ADECA « *Amino Density Estimation by Colorimetric Assay* »

Dans le but de valider l'assemblage de l'unité hybride (Dendrigraft de Poly(L-lysine) (DGL) + Elactiv'), un test ADECA a été réalisé. Le greffage covalent d'Elactiv' à la surface des DGL requiert un bras espaceur, le NHS-C4-maléimide (fourni par COLCOM), qui de part son groupement maléimide, réagit préférentiellement avec la fonction thiol (-SH), présent au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine élastique, pour former une liaison thioéther (**Figure 47**). Cette réaction est rendue possible en milieu tamponné (pH 6,5-7,5).

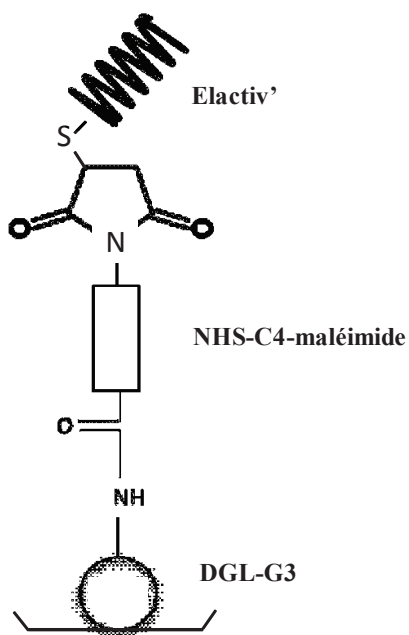


Figure 47: Schéma représentant l'assemblage de l'unité hybride (DGL-G3 + NHS-C4-maléimide + Elactiv').

VIII.1.1. Principe

Le test ADECA est une méthode validée par l'entreprise COLCOM et brevetée par le Centre National d'Etudes Spaciales (Coussot, Nicol *et al.* 2009) (Coussot, Perrin *et al.* 2011) permettant de caractériser et contrôler, de façon précise et reproductible, la densité de groupements amines primaires (NH_3^+) sur une grande variété de supports (géométrie, nature) en utilisant différentes méthodes de greffage (covalent, adsorption). C'est un procédé colorimétrique rapide reposant sur une interaction spécifique NH_2 /bleu de Coomassie (CBB, Coomassie Brilliant Blue). Après lavages pour éliminer le bleu qui n'a pas réagi, le bleu complexé aux groupements amines est élué et quantifié (**Figure 48**).

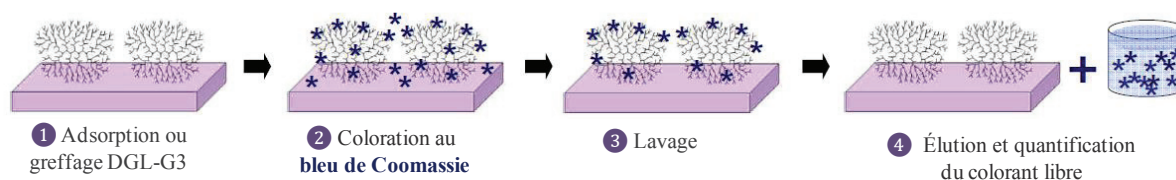


Figure 48: Principe du Test ADECA «Amino Density Estimation by Colorimetric Assay».

VIII.1.2. Préparation des plaques

La protéine Elactiv' a été greffée covalamment à la surface des DGL-G3 par l'intermédiaire d'un bras espaceur, le NHS-C4-maléimide. Les DGL ont dans un premier temps été adsorbés puis greffés sur des microplaques pour un contrôle optimal de la densité de groupements amines primaires.

Adsorption des DGL-G3 sur plaques

Les DGL-G3 ont été adsorbés sur une microplaque de polystyrène standard ($0,32 \text{ cm}^2$ / puits) à une concentration finale de $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$ dans du PBS pendant 2h à 4°C . La microplaque a été rincée trois fois dans du PBS. Le bras espaceur, NHS-C4-maléimide, a été greffé sur les DGL-G3 suivant une gamme de concentration variant de 0 à $2,8 \text{ mg/ml}$ dans du PBS pendant 2h à température ambiante. La microplaque a une nouvelle fois été rincée trois fois au PBS, avant le greffage d'Elactiv' sur le groupement maléimide suivant une gamme de concentration variant de 0 à $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ dans du PBS pendant 2h à 4°C . La microplaque a été rincée trois fois au PBS.

Ce protocole a été utilisé avec une large variété de tampons de greffage, notamment des tampons salins (PBS, NaCl (0,3 M- 0,5 M) ; Hépès ; Tris-HCl 20 mM pH 7) dans le but de diminuer les forces de répulsions entre les DGL-G3 et Elactiv' mais également avec des détergents (PBS, Tween 0,1 à 1% v/v) dans la perspective de débobiner Elactiv' et ainsi présenter sa fonction thiol (-SH), présent au niveau de son extrémité N-terminale, au groupement maléimide du bras espaceur.

Greffage covalent des DGL-G3 sur plaques

Ce protocole a été mis au point et validé par COLCOM (Coussot *et al.*, 2011) dans le but d'obtenir une monocouche homogène de polymères sur la surface des microplaques de polystyrène. Pour cela, les DGL-G3 ont été greffés sur une microplaque Costar DNA bind (0,32 cm²/ puits) à une concentration de 10 mg/ml pendant 12h à température ambiante dans du tampon carbonate (0,1 M ; pH 9,6). Après greffage, les DGL-G3 qui n'ont pas réagi ont été éliminés en lavant deux fois la microplaque avec du tampon carbonate (0,1 M ; pH 9,6) avant d'être plongée dans un bain à ultrasons, contenant un mélange de tampon carbonate 0,25 M pH 11,25 avec du méthanol (v/v, 1:1), pendant 2h à température ambiante. La microplaque a été lavée dans de l'acide acétique 1% (v/v) puis dans l'eau. Le bras espaceur, NHS-C4-maléimide, a été greffé sur les DGL-G3 suivant une gamme de concentration variant de 0 à 2,8 mg/ml dans du PBS pendant 2h à température ambiante. La microplaque a été plongée dans un bain à ultrasons contenant du PBS-T 0,1% (v/v) pendant 2 min à température ambiante, puis lavée à l'eau. Elactiv' a été greffée sur le groupement maléimide suivant une gamme de concentration variant de 0 à 100 µg/ml dans du PBS pendant 2h à 4°C. La microplaque a été plongée une dernière fois dans un bain à ultrasons contenant du PBS-T 0,1% (v/v) pendant 2 min à température ambiante, puis lavée à l'eau.

VIII.1.3. Préparation du CBB (Coomassie Brilliant Blue)

50 mg de CBB (Coomassie Brilliant Blue) (Sigma-Aldrich) ont été pesés et placés dans une fiole jaugée en verre de 100 ml et 5 ml d'acide acétique (CH₃COOH) ont été ajoutés. Après avoir bouché la fiole en verre, celle-ci a été placée 10 sec dans un bain à ultrasons afin d'homogénéiser la solution. Puis, 10 ml de méthanol (MeOH) ont été ajoutés à la solution avant de procéder à la même étape d'homogénéisation. Après dissolution complète, 70 ml d'eau ultra pure (18 MΩ) ont été ajoutés dans la fiole, qui a ensuite été recouverte d'un film d'aluminium et placée une dernière fois pendant 10 sec dans le bain à ultrasons dans le but d'homogénéiser et de dégazer la solution.

La fiole a été sorti du bain et laissée bouchée pendant 10 min à température ambiante avant d'ajuster le trait de jauge avec de l'eau ultra pure. La solution de coloration a été stockée à la lumière et à température ambiante.

VIII.1.4. Test ADECA

Le test ADECA a été effectué dans les micropuits fonctionnalisés, après lavage avec de l'eau ultra pure. L'étape de coloration a été effectuée en ajoutant 200 µl par puits de solution de coloration CBB (500 mg/l de CBB dissous dans du méthanol 10% v/v, de l'acide acétique 5% v/v, et de l'eau ultra pure 85%) pendant 2 min à température ambiante, sous agitation constante. L'excès de colorant a été éliminé en lavant les micropuits trois fois avec du tampon de décoloration (méthanol 10% v/v, acide acétique 5% v/v, et eau), et deux fois avec de l'eau ultra pure. L'étape de détection a été réalisée en ajoutant 250 µl par puits de tampon de détection (mélange de tampon bicarbonate de sodium à 250 mM pH 11,25 avec du méthanol 1:1v/v), la solution devient rose. Après agitation, les 250 µl de solution ont été retirés et placés dans de nouveaux micropuits de polystyrène contenant 20 µl d'acide chloridrique (HCl) 3N. Le bleu de Coomassie s'est acidifié et a retrouvé sa couleur bleue initiale. L'absorbance a été lue à 611 nm avec un lecteur microplaque Tecan Infinite® M1000PRO (Tecan).

VIII.2. Contrôle du greffage par immuno-marquage

Cette technique a permis de vérifier le greffage d'Elactiv' sur le bras espaceur (NHS-C4-maléimide) par l'intermédiaire de l'anticorps anti-flag, spécifique à l'extrémité N-terminale de la protéine élastique.

VIII.2.1. Principe

La technique en phase solide est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à un anticorps secondaire. Le test se compose de quatre grandes étapes :

1) Fixation de l'antigène : L'antigène connu (Elactiv'), spécifique de l'anticorps à doser (anticorps anti-flag), est adsorbé sur une microplaque, qui est ensuite lavée pour éliminer les antigènes non fixés.

2) Fixation de l'anticorps à doser : L'anticorps à doser (anticorps anti-flag) est incubé en présence de l'antigène. Les anticorps non fixés sont éliminés après le lavage des puits. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés.

3) Fixation de l'anticorps de détection : Un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (anti-IgG couplé à HRP « HorseRadish Peroxidase ») est incubé en présence du complexe antigène-anticorps (Elactiv' - Anticorps anti-flag). Il va reconnaître spécifiquement l'anticorps primaire. La peroxydase est une enzyme de type oxydase, permettant la dégradation des peroxydes. L'oxydation de divers substrats permet d'obtenir un composé chromogénique comme produit final. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.

4) Révélation colorimétrique : Un substrat spécifique à l'enzyme (le TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) est ajouté. Si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), le substrat va être transformé et induire une coloration bleue. La réaction est arrêtée avec de l'HCl 2N ou de l'acide sulfurique (H₂SO₄) 1N avant que le témoin négatif de devienne bleu, entraînant une coloration jaune des puits. L'absorbance est lue à 450 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines immobilisées.

VIII.2.2. Protocole

Dans le but de valider le greffage de la protéine Elactiv' sur le groupement maléimide du bras espaceur (NHS-C4-maléimide), la technique d'immuno-marquage a été utilisée en dosant l'anticorps anti-flag spécifique d'Elactiv'. Ainsi si Elactiv' se greffe, par sa fonction thiol libre, au NHS-C4-maléimide (lui-même greffé à la surface des DGL-G3), alors l'anticorps anti-flag reconnaîtra spécifiquement l'étiquette flag présent à l'extrémité N-terminale d'Elactiv'. La fixation de l'anticorps secondaire anti-HRP et l'ajout de TMB induira une coloration bleue des puits confirmant ainsi le greffage d'Elactiv' sur le NHS-C4-Maléimide (**Figure 49**). En revanche, si la coloration bleue se confirme également pour la condition DGL-G3 + Elactiv' sans greffage covalent, cela signifiera que la protéine s'adsorbe à la surface des DGL.

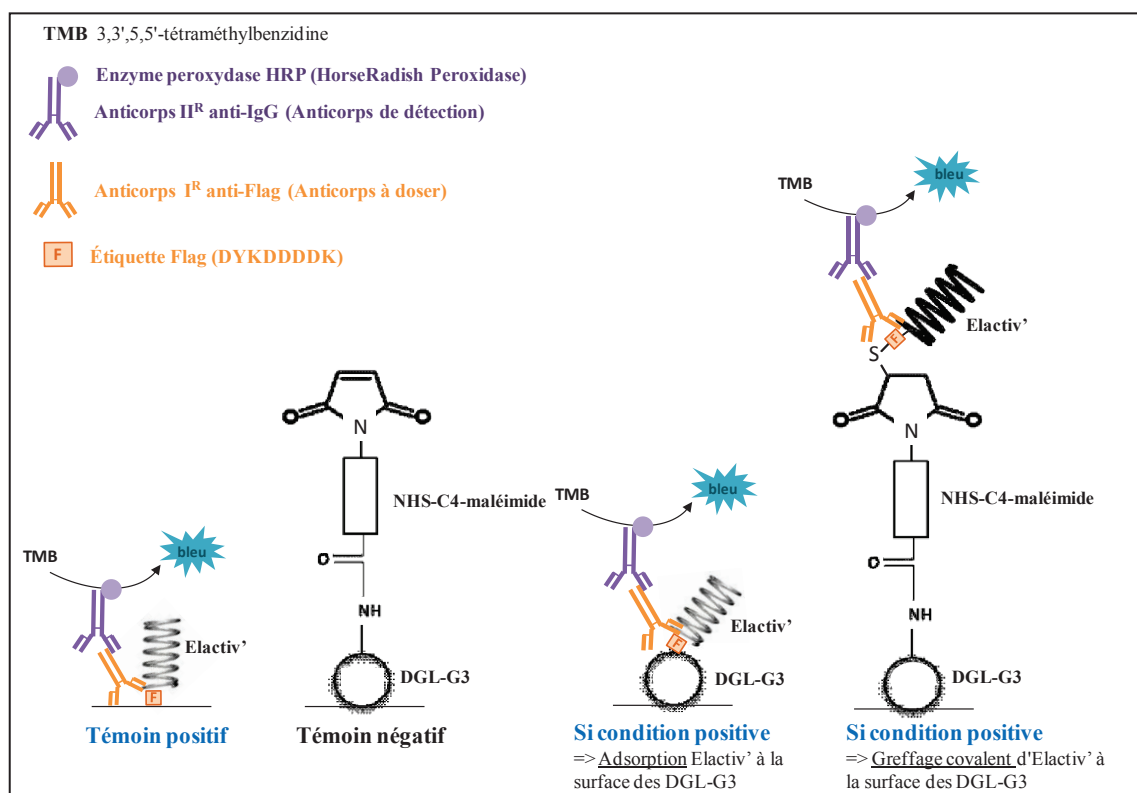


Figure 49: Greffage par immuno-marquage de l'unité hybride (DGL-G3 + NHS-C4-maléimide + Elactiv').

Pour le greffage par immuno-marquage, les DGL-G3 et Elactiv' ont été adsorbés sur une microplaque Nunc aux concentrations respectives de 10 µg/ml et 50 µg/ml dans du PBS, 2h à 4°C. Le NHS-C4-maléimide a été, quant à lui, greffé à 0,28 mg/ml dans du PBS, 30 min à température ambiante. Le tampon de rinçage utilisé, entre chaque greffage, était du PBS-Tween (PBS-T) 0,1% v/v. Les puits ont ensuite été saturés avec de la BSA 5% dans du PBS-T 0,1% v/v (200 µl/puits), 1h à température ambiante. L'anticorps primaire anti-flag, anti-souris (A2220 Sigma-Aldrich), dilué au 1/50000^{ème} dans du PBS-T 0,1% v/v, (100 µl/puits) a été ajouté pendant 1h à température ambiante. Les puits ont ensuite été lavés trois fois au PBS-T 0,1% v/v avant d'ajouter l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase (32430, Thermo Scientific), dilué au 1/100000^{ème} dans du PBS-T 0,1% v/v (100 µl/puits), 1h à température ambiante. Les puits ont lavés cinq fois au PBS-T 0,1% avant d'ajouter le TMB (Thermo Scientific) (100µl/puits). La réaction a été arrêtée avec de l'HCl 2N ou de l'acide sulfurique (H₂SO₄) 1N avant que le témoin négatif ne soit devenu bleu, entraînant une coloration jaune des puits. L'absorbance a été lue à 450 nm avec un lecteur microplaque Tecan Infinite® M1000PRO (Tecan).

VIII.2.3. Greffage covalent d'Elactiv' sur N-(5-fluorescéine) maléimide

Dans le but de valider l'accessibilité du thiol libre de la protéine Elactiv', un groupement maléimide couplé à un fluorophore a été utilisé. Le choix du fluorophore s'est orienté vers le N-(5-fluorescéine) maléimide (Sigma-Aldrich). Ce groupement maléimide-fluorescéine a ainsi permis de suivre la réaction entre le thiol libre, présent à l'extrémité N-terminale de la protéine, et le groupement maléimide du bras espaceur (**Figure 50**: cercle en rouge).

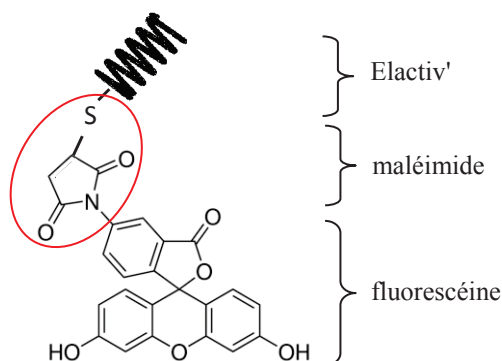


Figure 50: Réaction entre le N-(5-fluorescéine) maléimide et la protéine Elactiv'.

Pour cela, différentes conditions ont été testées, à savoir : ① N-(5-fluorescéine) maléimide (*contrôle négatif*); ② DGL-G3 + N-(5-fluorescéine) maléimide (*contrôle négatif*); ③ DGL-G3 + Elactiv' + N-(5-fluorescéine) maléimide (cette condition a permis de confirmer ou non l'adsorption de la protéine à la surface des DGL); ④ Elactiv' + N-(5-fluorescéine) maléimide (*réaction étudiée*).

Les DGL-G3 et Elactiv' ont été adsorbés sur une microplaque de polystyrène standard (0,32 cm²/ puits) à une concentration finale de 10 µg/ml dans du PBS pendant 2h à 4°C. La microplaque a été rincée trois fois au PBS ou PBS-T 0,1 % v/v. Après sa solubilisation dans du *N,N*-diméthylformamide (DMF), le N-(5-fluorescéine) maléimide a été greffé sur les DGL-G3, Elactiv' et DGL + Elactiv' à une concentration finale de 0,5 mg/ml dans du PBS pendant 30 min à température ambiante. La microplaque a été rincée trois fois puis 200 µl de PBS ou PBS-T 0,1 % v/v ont été ajoutés dans chacun des puits avant lecture de la fluorescence au lecteur microplaque Tecan Infinite® M1000PRO (Tecan) à 492 nm et 518 nm pour des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectives.

IX. Hydrogel composite Elactiv'/DGL-G3

IX.1. Conception de l'hydrogel

Afin de former un hydrogel composite Elactiv'/DGL-G3, les fonctions amines des résidus lysine du DGL ont été réticulées par l'intermédiaire d'un bras de réticulation (le polyéthylène glycol, de masse moléculaire 2000 g.mol⁻¹) possédant une double fonctionnalité succinimidyl (*O,O'*-Bis[2-(*N*-Succinimidyl-succinylamino)éthyl] : NHS-PEG-NHS (Sigma-Aldrich). Les réactions successives du NHS-PEG-NHS sur les amines des DGL ont permis de former un réseau réticulé par la création de fonctions amides.

La porosité au sein des hydrogels a été obtenue par l'incorporation de billes de paraffines de granulométrie contrôlée. Ces dernières ont été préparées par une méthode d'émulsion. 150 ml d'une solution de 0,5 % d'alcool polyvinylique dans de l'eau pure (PVA, de masse moléculaire 44,0526 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich) ont été chauffés à 70°C. En parallèle, 5g de paraffine (Sigma-Aldrich) ont été mis à fondre en veillant à ce qu'il n'y ait pas d'ébullition. En maintenant une température de 70°C, une forte agitation a été mise en place dans la solution de PVA par un agitateur magnétique et un barreau aimanté. La paraffine liquide a alors été versée et l'agitation conservée pendant 30 min. A ce terme, la solution de PVA-paraffine chaude a été versée dans un bain d'eau glacée afin de solidifier la paraffine sous forme de billes. Les billes ont ensuite été filtrées successivement avec des tamis de 250µm, 180 µm, 100µm et 50 µm afin de les séparer par granulométrie, puis les différentes fractions collectées ont été lyophilisées et conservées à 4°C.

La formation des gels poreux se fait en déposant 500 mg de billes de paraffine dans un microtube 2 ml MCT-200-L-C (Genuine Axygen Quality). Les billes ont été tassées au fond du tube par tapotement et par centrifugation (centrifugeuse de paillasse, 15 sec, 800 rpm). Puis 200 µl d'une solution de DGL à 100 mg/ml (PBS) a été mélangée à une solution de 150 µl de protéine Elactiv' à une concentration de 2,2 mg/ml (PBS), et le tout a été conservé sur glace. Une solution de NHS-PEG-NHS (400 mg/ml de DMF, Sigma-Aldrich) a ensuite été ajoutée au mélange précédent, puis vortexée et déposée à la surface des billes dans le microtube de 2ml. Rapidement, une centrifugation (1-2 sec) a été appliquée pour faire pénétrer le gel au sein du réseau de billes de paraffine. La réticulation est effective en une quinzaine de sec.

L'extraction de la paraffine a été effectuée par des bains successifs des hydrogels dans de l'éthanol pur porté à ébullition. Trois bains d'une heure sont suffisants pour extraire visuellement la totalité de la paraffine. Les hydrogels poreux ont ensuite été placés dans du PBS et conservés à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

IX.2. Analyse mécanique dynamique (AMD)

IX.2.1. Principe

L'analyse mécanique dynamique est une technique de grande précision pour mesurer les propriétés viscoélastiques des matériaux. Elle consiste à appliquer une déformation sinusoïdale à un échantillon et mesurer la force résultante transmise par ce dernier à l'aide d'un analyseur mécanique dynamique. Cet instrument permet la réalisation d'analyses automatisées en appliquant à un échantillon une excitation dynamique contrôlée en fréquence et en amplitude dans des conditions définies par l'opérateur. L'AMD permet de déterminer des grandeurs physiques intrinsèques au matériau telles que le module complexe d'Young, noté E^* , le rapport de l'énergie restituée par le matériau au cours de la phase de décharge, ou encore la tangente delta, notée $\tan \delta$, qui correspond au rapport de l'énergie dissipée lors d'un cycle de compression sur le module élastique, et est défini comme le facteur d'amortissement. La valeur de la $\tan \delta$ varie de 0, pour les matériaux élastiques, à 1 pour les matériaux visqueux voire solides.

IX.2.2. Protocole

Les hydrogels composites poreux Elactiv'/DGL-G3 (50 :50), d'épaisseur 2 mm ont été analysés en émersion par un analyseur mécanique dynamique Bose 3100 pour une amplitude de déplacement contrôlée de 10% de son épaisseur, à une fréquence de 100 Hz et une vitesse de 40 000 $\mu\text{m.s}^{-1}$. Comme pour les tests d'indentation réalisés sur l'hydrogel Elactiv' (paragraphe VI.2), le rapport de l'énergie restituée par l'hydrogel et le module d'Young ont pu être calculé à partir de la courbe de charge-décharge obtenue.

IX.3. Implantation de l'hydrogel en sous-cutanée chez la souris

Dans le but d'étudier *in vivo* la biocompatibilité et la dégradation de l'hydrogel composite Elactiv'/DGL-G3, ce dernier a été implanté en sous-cutané chez la souris selon le même protocole détaillé dans le paragraphe VI.4 « Implantation des hydrogels Elactiv' en sous-cutanée chez la souris ». Néanmoins, dans cette étude, seulement deux hydrogels ont été implantés, un premier au niveau du coup de la souris et un deuxième au niveau des lombaires (Figure 51).

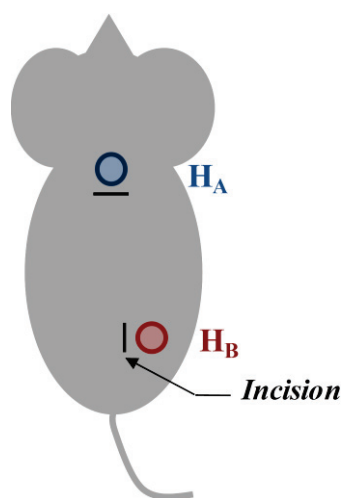


Figure 51: Schéma d'implantation des hydrogels composites poreux Elactiv'/DGL-G3 (HA et HB) en sous-cutanée chez la souris.

Des analyses histologiques (coloration standard HES: Hématéine/Eosine/Safran), ont permis d'évaluer la colonisation de l'hydrogel par les cellules murines mais également la vascularisation, la dégradation du biomatériau et la réaction inflammatoire (protocoles décrits dans le paragraphe VI.5 « Techniques d'histologie »).

X. Analyses statistiques

Les données de ce travail de thèse sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur standard moyenne) ou \pm SD (écart-type). Les analyses statistiques sont effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism software (GraphPad, La Jolla, Etats-Unis). Un test ANNOVA suivi d'un post-test Bonferroni ou d'un post-test Newman-Keuls est appliqué pour la détermination des valeurs de p. Les données sont considérées comme significativement différentes si la valeur de p est inférieure à 0,05

RESULTATS

I. Synthèse et caractérisation d'une protéine élastique: Elactiv'

I.1 Conception et synthèse de la protéine Elactiv'

La protéine Elactiv' a été conçue en respectant la structure unique de la tropoélastine humaine. Comme la protéine native, Elactiv' présente une alternance de domaines hydrophobes (VGVAPG-VGVLPG) et de réticulation (AAAKAAAKAAK). La sélection de ces motifs a été fonction de leur stricte conservation entre les différentes espèces (VGVLPG et AAKAAAKAAK), et de leur large répétition dans la tropoélastine humaine (VGVAPG répété 6 fois dans la protéine native) (Debelle and Alix 1999). Ces séquences alternatives ont été complétées par une région C-terminale correspondant au domaine 36 de la tropoélastine humaine, composée d'un pont disulfure et du motif GRKRRK chargé positivement. Ce dernier étant reconnu pour faciliter l'assemblage des fibres élastiques (Nonaka, Sato *et al.* 2014). Une étiquette *FLAG* (DYKDDDDK) a également été ajoutée au niveau de l'extrémité N-terminale de la séquence de la protéine pour faciliter son identification au cours de la production et sa détection lors des expériences cellulaires (**Figure 52.A**).

Le gène Elactiv' a pu être cloné dans le vecteur d'expression procaryote pET30a. Le vecteur recombinant pET30a-Elactiv' a été utilisé pour transformer les bactéries compétentes *E. coli* BL21 (DE3). L'induction des bactéries avec 1 mM d'IPTG a permis l'expression d'Elactiv'. Suite à la lyse des cellules et l'analyse SDS-PAGE des fractions cellulaires après centrifugation, Elactiv' a été retrouvée à la fois dans les fractions soluble et insoluble (**Figure 52.B**). Ce résultat valide ainsi les conditions de production de la protéine Elactiv'.

Afin de purifier la protéine Elactiv' produite, la méthode « d'Inverse Transition Cycling » (ITC) (Yeo, Aghaei-Ghareh-Bolagh *et al.* 2015) s'est révélée efficace grâce à sa capacité intrinsèque de coacervation. Elactiv' a pu être purifiée à partir de la fraction soluble d'*E. coli*. L'analyse par SDS-PAGE et coloration du gel aux nitrates d'argent de la fraction précipitée après un cycle d'ITC, révèle une bande majoritaire (> 90%) de masse apparente à 55 kDa pouvant correspondre à Elactiv' (**Figure 52.C**). L'identification d'Elactiv' est confortée par analyse en western-blot utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette FLAG, présente au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine (**Figure 52.D**). Une bande de faible intensité apparaît également avec une masse apparente de 110 kDa pouvant correspondre à un dimère non réduit de la protéine.

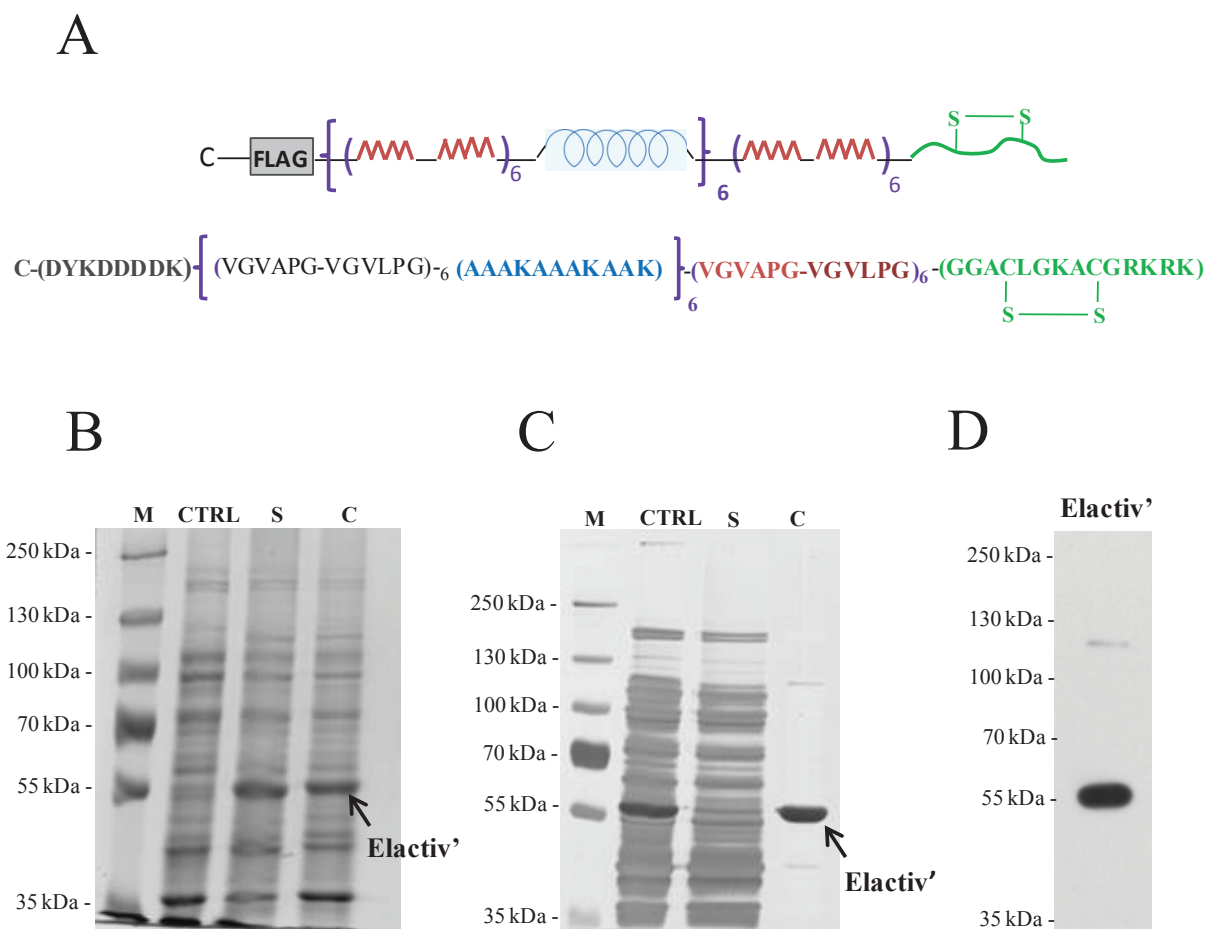


Figure 52: Conception et synthèse de la protéine Elactiv'. A/ Représentation schématique et séquence primaire de la protéine élastique Elactiv'. B/ Expression Elactiv' : Profil de migration d'Elactiv' exprimée dans un gel SDS-PAGE, avec une bande proéminente à la masse moléculaire appropriée, d'environ 55 kDa. Les résultats sont présentés pour les cultures non induite et induite. M correspond au marqueur électrophorétique de masse moléculaire ; CTRL correspond à la culture des bactéries transformées BL21 (DE3) avant induction à l'IPTG ; S représente le surnageant de la culture des bactéries BL21 (DE3) après induction à l'IPTG, suivie d'une centrifugation et C représente le culot des bactéries BL21 (DE3) après 4h de traitement avec 1 mM d'IPTG, suivie d'une centrifugation. C/ Purification de la protéine élastique Elactiv' à partir de la méthode « d'Inverse Transition Cycling » (ITC) : CTRL correspond au lysat bactérien avant ITC, S et C représentent respectivement le surnageant et le culot après un cycle d'ITC suivi d'une centrifugation. S contient les impuretés tandis que C représente la protéine Elactiv' pure. Les échantillons sont analysés par SDS-PAGE et le gel est coloré aux nitrates d'argent. D/ Identification d'Elactiv' après analyse par western-blot en utilisant un anticorps anti-FLAG dirigé contre l'étiquette FLAG, présente à l'extrémité N-terminale d'Elactiv'.

I.2. Caractérisation physico-chimique de la protéine Elactiv'

I.2.1. Caractérisation biochimique

Elactiv' présente une masse moléculaire théorique de 50,6 kDa et un point isoélectrique très basique de 10,31 du même ordre que la tropoélastine humaine (10,4), en raison de la conformité entre les structures primaires des deux protéines, comme il sera discuté ultérieurement. L'analyse de la protéine Elactiv' par une chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), en utilisant la dissociation de transfert d'électrons (ETD), a permis de confirmer la présence du pont disulfure au niveau de son extrémité C-terminale (**Figure.53**). La digestion de la protéine Elactiv' par la trypsine, une endoprotéase qui clive les liaisons peptidiques après les résidus de lysine et d'arginine, permet de générer un nombre de peptides dont un, le peptide [579-594] qui correspond à l'extrémité C-terminale de la protéine Elactiv' (PGGGACLGKACGRKRK). Après analyse par LC-MS/MS, le peptide [579-594] présente une masse moléculaire similaire à la masse moléculaire théorique pour le même peptide en présence du pont disulfure. En conclusion, la protéine Elactiv' conserve le pont-disulfure au niveau de son extrémité C-terminale, similaire à la tropoélastine humaine (TE).

I.2.2. Spectroscopie par dichroïsme circulaire

La spectroscopie par dichroïsme circulaire a permis de déterminer les structures secondaires de la protéine Elactiv' (**Figure 54.A**) en comparaison avec la tropoélastine humaine recombinante (hTE) (**Figure 54.B**). Les spectres ont été enregistrés en solution dans le PBS à 5, 20, 40 et 60°C pour une concentration d'Elactiv' de 0,2 mg/ml. Aux basses températures (5 et 20°C), les profils d'Elactiv' et hTE sont caractérisés par un pic négatif à 198 nm et un épaulement négatif à 220 nm, moins prononcé pour Elactiv', suggérant une conformation prédominante en hélice gauche de type poly proline II (PPII), similaire à la tropoélastine humaine. Lorsque la température augmente de 20 à 60°C, le pic est légèrement décalé vers le rouge, particulièrement pour Elactiv', et réduit en intensité pour les deux protéines entraînant une diminution de la stabilité de l'hélice PPII. En conclusion, Elactiv' se replie majoritairement sous la forme d'une hélice gauche de type polyproline II (PPII) lorsque la température de la solution est de 20°C, de façon similaire à la TE. De plus, Elactiv' présente le même comportement que la TE lorsque la température de la solution augmente progressivement jusqu'à atteindre 60°C, soulignant sa sensibilité à la chaleur.

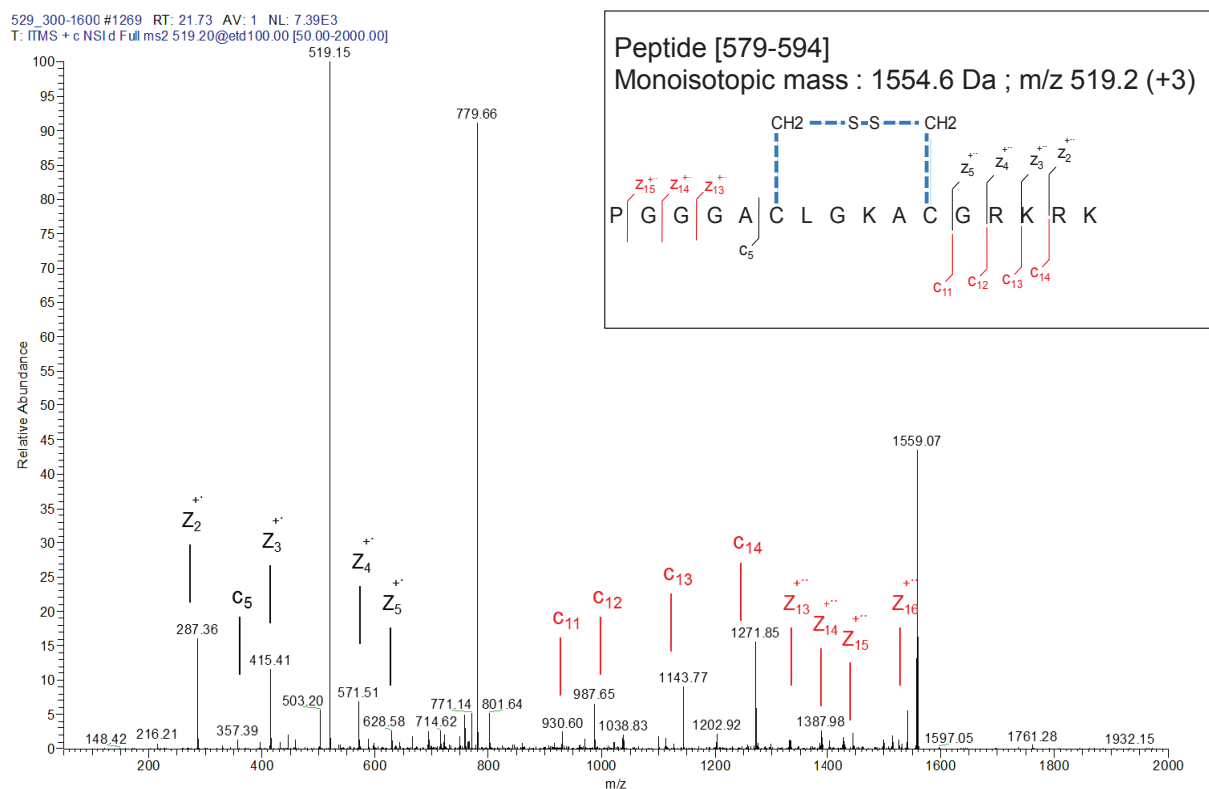


Figure 53: Analyse de la protéine Elactiv' par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) : fragmentation de la protéine Elactiv' [579-594] en utilisant le mode dissociation de transfert d'électrons (ETD).

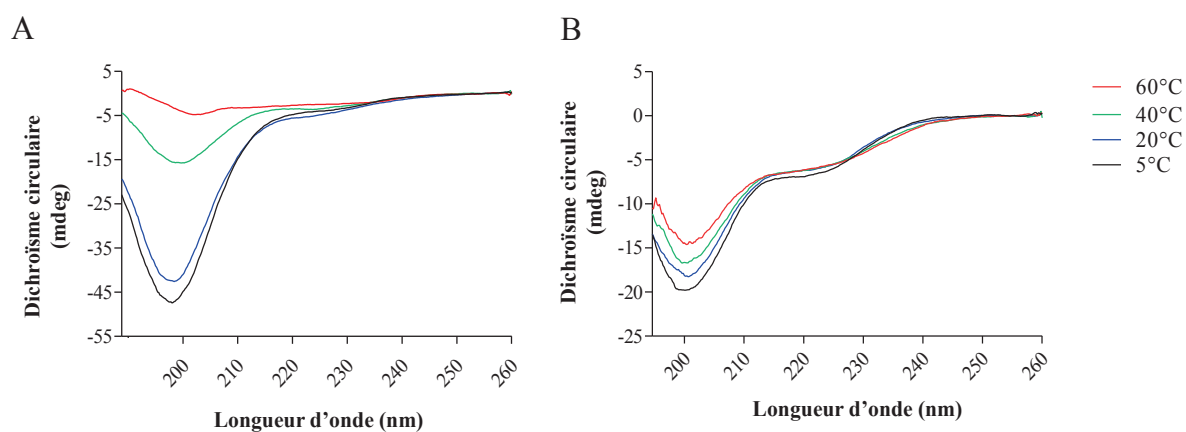
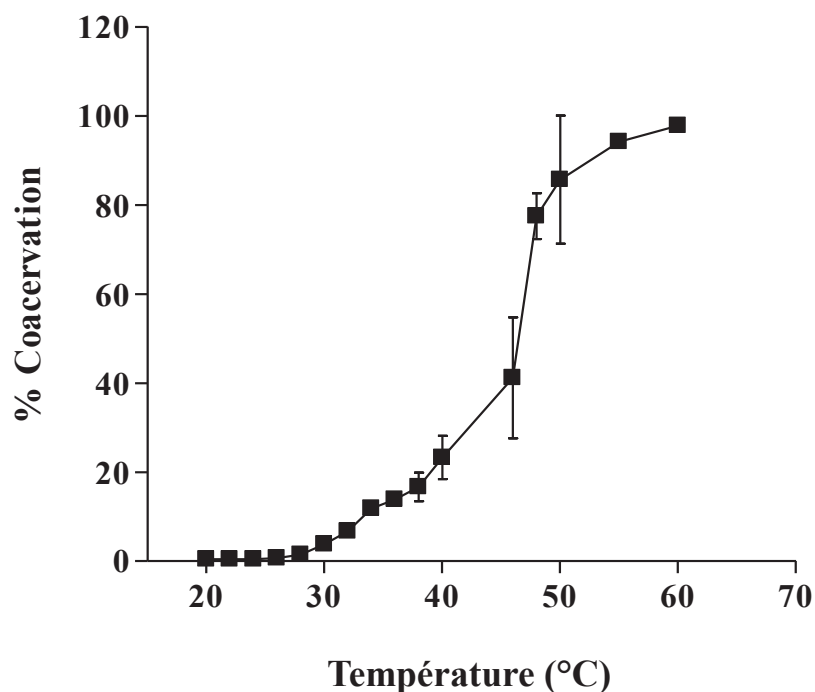


Figure 54: Spectres de dichroïsme circulaire de la protéine élastique Elactiv' (A) et de la tropoélastine humaine recombinante (hTE) (B) enregistrés à 5°C (en noir), 20°C (en bleu), 40°C (en vert) et 60°C (en rouge) dans du PBS, pH 7,4.

I.2.3. Caractérisation thermique

Le profil thermique d'Elactiv' révèle que la coacervation d'une solution d'Elactiv' dans le PBS s'initie aux alentours de 30°C, correspondant à sa température de transition (Tt) (**Figure 55.A**). La coacervation maximale est obtenue à 60°C. De plus, les mesures de diffusion dynamique de la lumière confirment une variation de la taille des agrégats d'Elactiv' en fonction de la température, ainsi que la formation de larges agrégats en suspension au-dessus de la Tt, provoquant une brusque augmentation de la turbidité (**Figure 55.B**). Les agrégats en-dessous de la Tt (20°C) ont une taille de 62,8 nm de diamètre alors qu'ils atteignent $1,3 \cdot 10^4$ nm de diamètre au-dessus la Tt (60°C). Après refroidissement de la solution d'Elactiv' à 20°C, la taille des agrégats diminue et atteint 81,9 nm de diamètre, ce qui prouve une transition réversible quasi complète. En conclusion, la protéine Elactiv' présente la capacité intrinsèque de coacervation, similaire à la TE, avec une température de transition réversible de 30°C.

A



B

	<div> <div>Temps</div> <div>→</div> </div>		
Température (°C)	20	60	20
Taille (nm) ± écart-type	61,1 ± 0,99	1,3.10 ⁴	68,5 ± 12,39

Figure 55: Caractérisation thermique de la protéine Elactiv'. A/ Profil de coacervation d'une solution d'Elactiv' à 1 mg/ml dans du PBS, pH 7,4 suivant une gamme de température variant de 20 à 60°C. La variation de la turbidité de la solution à chaque point de température est exprimée en pourcentage par rapport à la valeur maximale. B/ Profil de la taille des agrégats d'Elactiv' formés au cours du processus de coacervation. Le chauffage suivi du refroidissement de la solution d'Elactiv' révèle une transition réversible quasi-complète. Les données représentent la moyenne ± SEM (n=3).

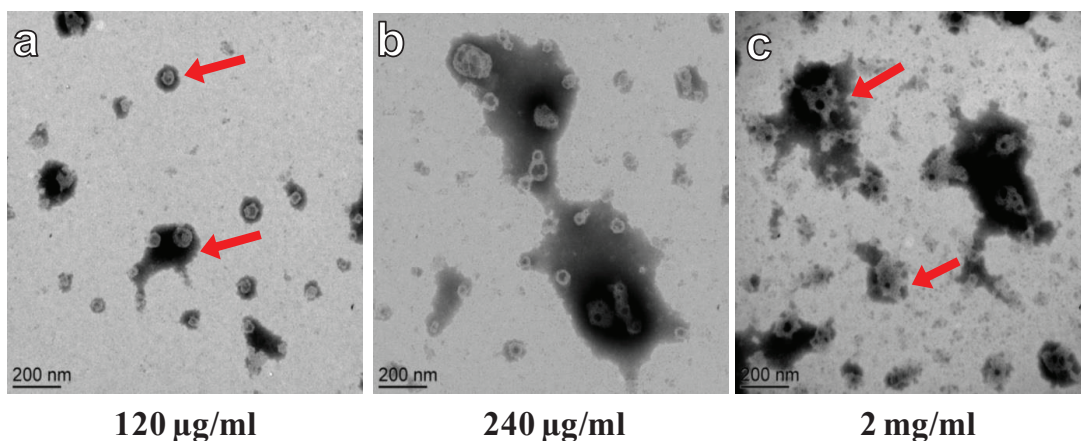
I.2.4. Modèle d'auto-assemblage *in vitro* des molécules Elactiv'

La coacervation de la tropoélastine humaine représente la première grande étape de l'assemblage des fibres élastiques. *In vitro*, ce processus est caractérisé par deux étapes : une étape initiale de séparation de phase, qui implique une température de transition réversible, suivie d'une étape de maturation définie par la coalescence irréversible des agrégats en structures fibrillaires (Yeo, Keeley *et al.* 2011). Par conséquent, nous avons cherché à savoir si la protéine Elactiv' était capable de suivre ces étapes d'auto-assemblage.

Pour cela, des solutions de 120 $\mu\text{g/ml}$ à 2 mg/ml ont été préparées dans du PBS puis chauffées au-dessus de la température de transition pour induire la coacervation. Elactiv' a ensuite été visualisée par coloration négative sur des grilles de microscopie électronique à transmission (MET). A 120 $\mu\text{g/ml}$, Elactiv' forme des petites sphères individuelles creuses car la densité électronique interne est faible (**Figure 56.A.a**). A partir de 240 $\mu\text{g/ml}$, les sphères commencent à fusionner et forment des agrégats dont le diamètre atteint 200 nm (Figure 5.A.b). A 2 mg/ml , les agrégats formés présentent une densité électronique externe élevée qui pourrait être due à la fusion des sphères individuelles d'Elactiv' (**Figure 56.A.c**).

La microscopie électronique à balayage (MEB) confirme que les grandes sphères observées à 2 mg/ml en MET, sont le résultat de la fusion des petites sphères (**Figure 56.B.b**). Cette technique nous donne plus de détails quant à la morphologie structurale des sphères. En effet, nous pouvons observer que les bords des sphères ne sont pas réguliers (**Figure 56.B.c**). En plus de s'organiser en sphères individuelles, les molécules d'Elactiv' fusionnent ensemble et se connectent comme des perles sur une chaîne, donnant des formes géométriques variées (**Figure 56.B.d-f**). Au cours du processus de coacervation, la protéine Elactiv' suit des étapes distinctes semblables à celles suivies par la TE, à savoir la formation de petites sphères suivi de leur agrégation pour former de plus grandes sphères, et enfin la fusion et la coalescence des sphères pour former une structure en filaments perlés.

A



B

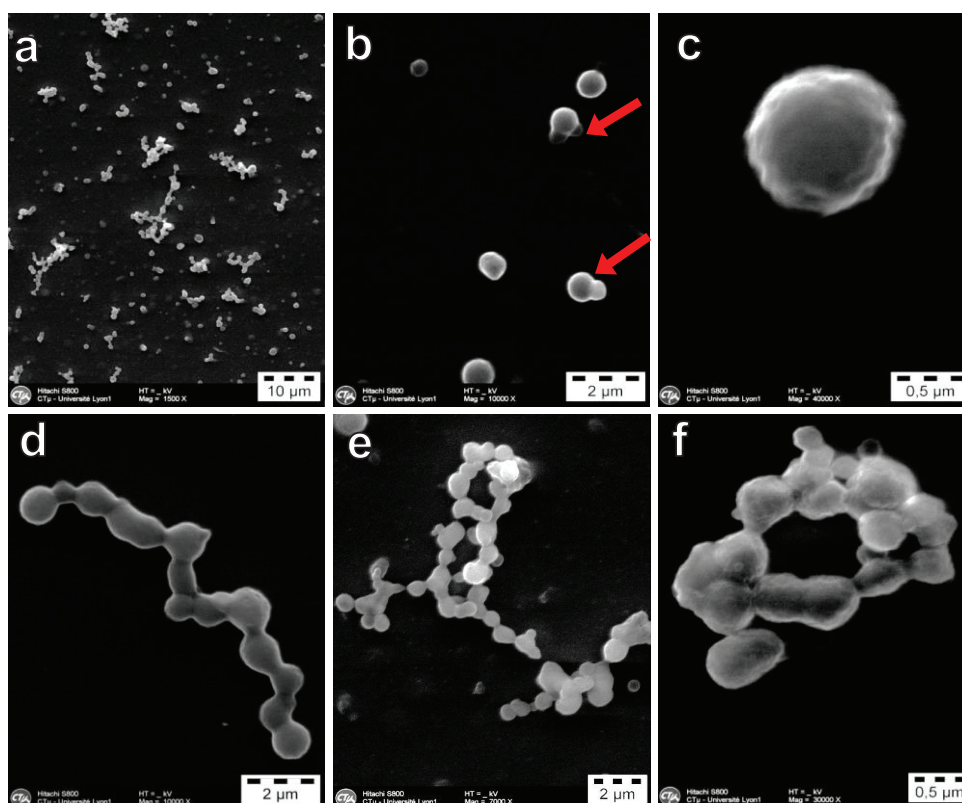


Figure 56: Modèle d'auto-assemblage *in vitro* des molécules Elactiv'. A/ MET des coacervats d'Elactiv' formés dans une solution (PBS) d'Elactiv' à 120 $\mu\text{g/ml}$ (a), 240 $\mu\text{g/ml}$ (b) et 2 mg/ml. B/MEB des structures d'Elactiv' (a) composées de petites sphères individuelles (b et c) et de sphères coalescentes (d, e et f) formées à partir d'une solution d'Elactiv' à 2 mg/ml dans du PBS.

I.3. Caractérisation de la protéine Elactiv' comme support pour la culture 2D de fibroblastes dermiques humains sains

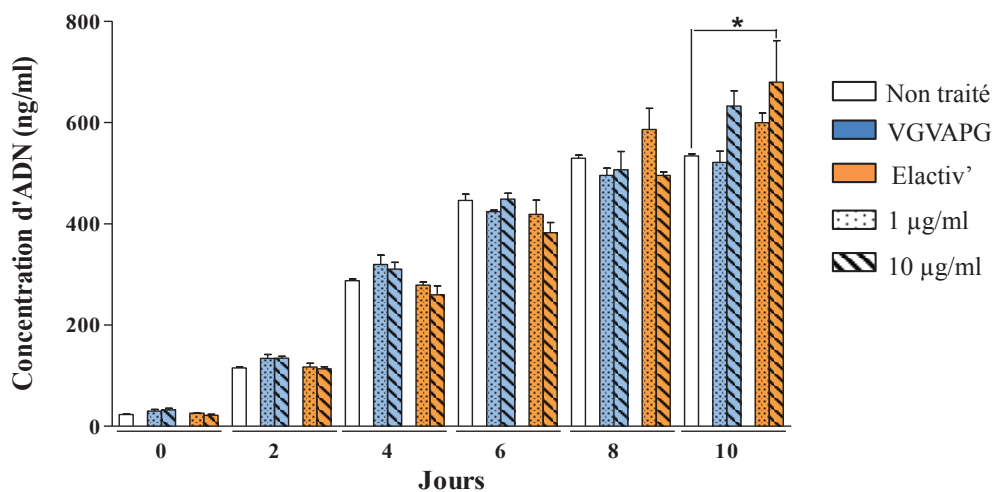
I.3.1. Viabilité et prolifération des fibroblastes

La biocompatibilité d'Elactiv' avec les fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF pour Normal Human Dermal Fibroblast) a été évaluée par un test de prolifération cellulaire en phase homogène (avec Elactiv' en solution dans le milieu de culture) et en phase hétérogène (adsorption Elactiv' sur des plaques de culture). Pour chaque test, les cellules ont été cultivées pendant 2 à 10 jours puis lysées pour permettre la quantification d'ADN.

En ce qui concerne la prolifération des NHDF en phase homogène, une augmentation significative de la prolifération cellulaire est observée 10 jours après ensemencement avec 10 µg/ml d'Elactiv', de façon similaire à l'hexapeptide hydrophobe VGVAPG (**Figure 57.A**). Cet effet est moindre lorsque la concentration en Elactiv' est de 1 µg/ml.

La prolifération des NHDF en phase hétérogène, sur des surfaces fonctionnalisées avec Elactiv' ne révèle aucune différence significative de prolifération des cellules après 10 jours de culture, comparé aux autres surfaces fonctionnalisées avec des protéines matricielles, telles que la BSA, le collagène de type I et l'hexapeptide hydrophobe VGVAPG (**Figure 57.B**). Les comportements différents de la protéine Elactiv', lorsqu'elle est en solution ou adsorbée sur une surface, sera discuté ultérieurement. Quoi qu'il en soit, ces résultats soulignent la biocompatibilité de la protéine Elactiv' à l'égard des fibroblastes dermiques humains, avec un comportement similaire à l'hexapeptide hydrophobe VGVAPG.

A



B

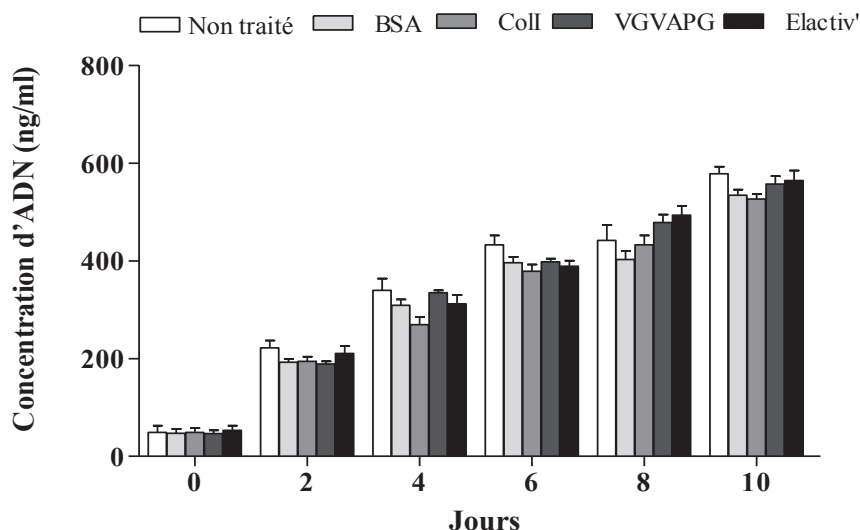


Figure 57: Prolifération des fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF pour *Normal Human Dermal Fibroblast*) en présence d'Elactiv'. A/ Suivi de la prolifération des

NHDF en phase homogène, en présence d'Elactiv' et du peptide VGVAPG, grâce à un test de quantification d'ADN. Les NHDF sont cultivés entre 2 et 10 jours avec du milieu de culture seul ou additionné d'Elactiv' ou de peptide VGVAPG à 1 et 10 µg/ml. Les données représentent la moyenne \pm SEM (n=3) et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Une ANOVA à deux facteurs suivie du post test Bonferroni a permis de déterminer les valeurs de p (* $p < 0,05$) avec comme référence la condition non traitée. B/ Suivi de la prolifération des NHDF en phase hétérogène sur différents supports grâce à un test de quantification d'ADN. Les données représentent la moyenne \pm SEM (n=4) et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Une ANOVA à deux facteurs suivie du post test Bonferroni, avec comme référence la condition non traitée, n'a pas permis de déterminer de différences significatives entre les conditions.

I.3.2. Etude des sites d'interactions de la protéine Elactiv' avec les fibroblastes

La conservation dans la structure primaire d'Elactiv' des séquences bioactives de la TE, à savoir le motif C-terminal GRKRK et l'unité de répétition hydrophobe VGVAPG, connus respectivement pour interagir avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et l'EBP (*Elastin Binding Protein*) dans la TE (Hinek and Rabinovitch 1994; Bax, Rodgers *et al.* 2009), sont susceptibles de conférer à la protéine Elactiv' des fonctions biologiques similaires.

Ainsi, nous avons voulu évaluer la fonctionnalité des motifs GRKRK et VGVAPG de la protéine Elactiv', à savoir s'ils sont capables d'induire l'adhérence cellulaire à travers ces récepteurs transmembranaires. Pour cela, l'adhérence des NHDF sur des surfaces fonctionnalisées avec Elactiv' a été étudiée en présence d'un anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ (clone LM609, (Bax, Rodgers *et al.* 2009)) et d'un inhibiteur de l'EBP, le L-lactose (Mecham, Hinek *et al.* 1989) (**Figure 58.A**). En présence de l'anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$, l'adhérence des NHDF sur des puits fonctionnalisés avec Elactiv' est inhibée de 30%, tandis que la supplémentation du milieu de culture avec du L-lactose (inhibiteur de l'EBP) entraîne une diminution de l'adhérence de 50%. Enfin, lorsque les deux inhibiteurs sont ajoutés au milieu de culture, l'adhérence des NHDF est alors réduite de 78%.

Par ailleurs, l'analyse de l'expression protéique de l'intégrine α_v , par western blot, lorsque les NHDF sont cultivés sur des surfaces préalablement fonctionnalisées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ d'Elactiv', révèle une augmentation de son expression de 4 fois par rapport au collagène de type I (pour une concentration équivalente) et au plastique brut, et de 3 fois comparé à la BSA (pour une concentration équivalente) (**Figure 58.B**). Ces résultats confirment la contribution des motifs VGVAPG et GRKRK de la protéine Elactiv' dans l'adhérence des fibroblastes dermiques et soulignent ainsi leur fonctionnalité et leur potentiel biologique.

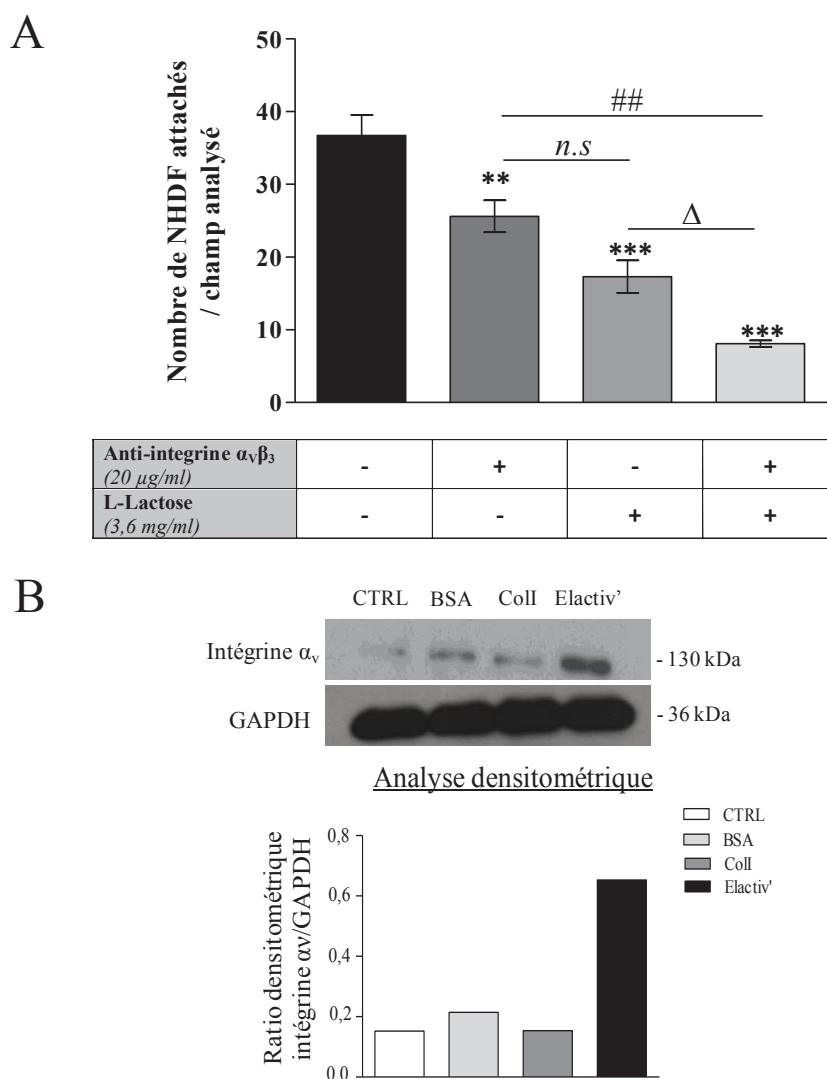


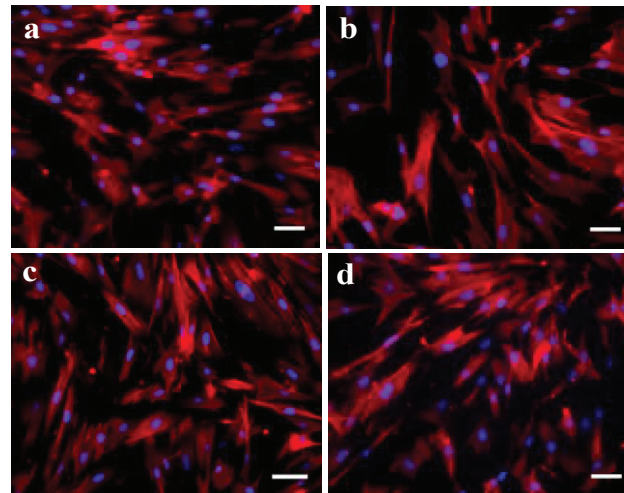
Figure 58: Etude des sites d'interaction d'Elactiv'. A/ Inhibition de l'attachement des NHDF sur des surfaces fonctionnalisées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ d'Elactiv', en présence ou en absence de l'anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ (clone LM609 utilisé à 20 $\mu\text{g/ml}$) et/ou de l'inhibiteur de l'EBP, le L-lactose (utilisé à 3,6 mg/ml). Les NHDF sont pré-incubés pendant 45 min avec l'anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ et/ou avec le L-lactose avant d'être ensemencés sur des lames en verre, fonctionnalisées avec Elactiv', pendant 90 min. Les données représentent la moyenne \pm SEM de deux expériences indépendantes. Une ANOVA à un facteur suivie d'un post test Bonferroni a permis de déterminer les valeurs de p, *** $p < 0,001$ et ** $p < 0,01$ avec comme référence le contrôle négatif (absence des deux bloqueurs) ; ## $p < 0,01$ et *n.s* non significatif avec comme référence la condition avec l'anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$; Δ $p < 0,1$ avec comme référence la condition avec le L-lactose. B/ Analyse par western blot de l'expression de l'intégrine α_v . Les cellules sont cultivées pendant 48h sur différents supports, avec en contrôle (CTRL) le plastique brut, avant l'extraction totale des protéines et l'analyse par western blot de l'expression de l'intégrine α_v . L'immunodétection de la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase) sert à normaliser puis quantifier les résultats, par analyse densitométrique grâce au logiciel Image J (n=1).

I.3.3. Influence de la protéine Elactiv' sur la différenciation myofibroblastique

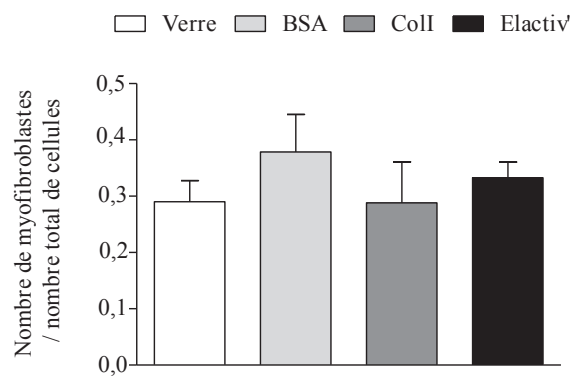
Les myofibroblastes, fibroblastes différenciés exprimant l'actine du muscle lisse (= α -SMA, *Smooth Muscle Actin*), sont considérés comme des acteurs majeurs en ingénierie tissulaire dans le remodelage tissulaire et le processus de cicatrisation des plaies, en permettant leur contraction et en synthétisant une matrice extracellulaire temporaire. Néanmoins, cette différenciation doit être contrôlée pour éviter la présence d'un trop grand nombre de myofibroblastes entraînant l'apparition de pathologies (Xerri, Clerc *et al.* 1991; Cheung, Walley *et al.* 2015). C'est la raison pour laquelle, nous avons cherché à savoir si la présence de la protéine Elactiv' pouvait influencer sur la différenciation des NHDF en myofibroblastes. Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si Elactiv' pouvait entraîner une modification dans la morphologie des fibroblastes dermiques. L'observation du cytosquelette d'actine des NHDF, cultivés pendant 48h sur des surfaces en verre préalablement fonctionnalisées avec Elactiv', ne semble pas indiquer que la présence d'Elactiv' influe sur la morphologie cellulaire.

En effet, les réseaux d'actine des NHDF cultivés sur Elactiv' sont visuellement similaires à ceux des NHDF cultivés sur verre, BSA et collagène de type I (**Figure 59.A**). Pour approfondir notre évaluation, l'actine α -SMA des cellules a été marquée, par immunofluorescence, et a permis la quantification du nombre de myofibroblastes sur le nombre total de cellules grâce au logiciel Image J. Les résultats révèlent que la présence de la protéine Elactiv' n'influe pas sur le nombre de myofibroblastes comparé au verre, à la SAB et au collagène de type I (**Figure 59.B**). De plus, l'analyse de l'expression protéique de l' α -SMA par western-blot, dans les mêmes conditions que précédemment, ne montre aucune variation en présence d'Elactiv', et ce quel que soit le support (**Figure 59.C**). Ces résultats suggèrent que la protéine Elactiv' n'a pas d'effet sur la morphologie des fibroblastes dermiques, en particulier sur leur différenciation en myofibroblastes.

A



B



C

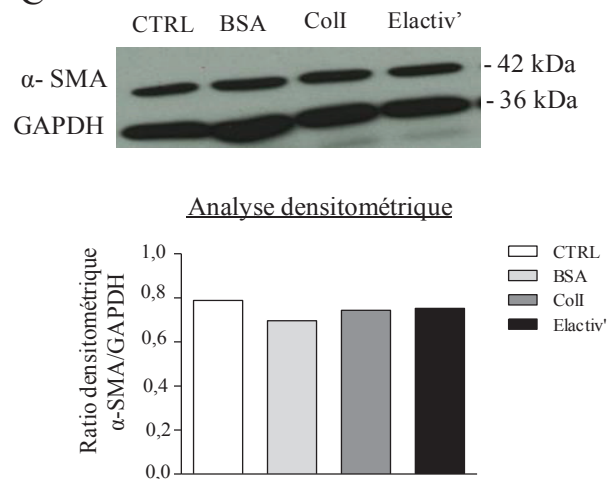


Figure 59: Influence de la protéine Elactiv' sur la morphologie des fibroblastes dermiques humains. A/ Observation du cytosquelette d'actine par microscopie à épifluorescence sur différents supports. Les fibroblastes sontensemencés pendant 48h sur du verre (a) fonctionnalisé avec de la BSA (b), du collagène de type I (c) et Elactiv' (d) à une concentration finale de 10 μg/ml pour chacun des composés. Après fixation des cellules, les noyaux cellulaires et les réseaux d'actine sont contremarqués en utilisant respectivement le colorant Hoechst (cyan) et la phalloïdine conjuguée à la rhodamine (rouge). Les barres d'échelle indiquent 50 μm. B/ Influence d'Elactiv' sur la différenciation myofibroblastique. Le même protocole que précédemment est réalisé. Après fixation des cellules, les NHDF sont marqués par immunofluorescence grâce à l'anticorps anti α-SMA. La quantification du nombre de myofibroblastes sur le nombre total de cellules est réalisée à l'aide du logiciel Image J (n=1). C/ Analyse par western blot de l'expression de l'expression d'α-SMA en présence d'Elactiv'. Les cellules sont cultivées pendant 48h sur différents supports, avec en contrôle (CTRL) le plastique brut, avant l'extraction totale des protéines et l'analyse par western blot de l'α-SMA. L'immunodétection de la GAPDH sert à normaliser puis quantifier les résultats, par analyse densitométrique, grâce au logiciel Image J (n=1).

I.3.4. Influence de la protéine Elactiv' sur la sécrétion des gélatinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMP pour *Matrix metalloproteinase*) appartiennent à la famille des protéases à zinc et sont capables conjointement de dégrader l'ensemble des protéines de la matrice extracellulaire. La présence de ces protéases, comme celle des myofibroblastes à une autre échelle, est considérée comme un marqueur majeur du remodelage tissulaire dans le processus de cicatrisation des plaies ou dans la pénétration des cellules au sein d'une matrice 3D exogène en ingénierie tissulaire. Néanmoins, une expression exacerbée des MMP est également considérée comme un marqueur péjoratif des mécanismes pathologiques tels que l'inflammation et l'invasion des cellules cancéreuses (Helary, Foucault-Bertaud *et al.* 2005; Antonicelli, Bellon *et al.* 2007; Fingleton 2007; Gill and Parks 2008). C'est pourquoi, nous avons cherché à savoir si la présence d'Elactiv' pouvait entraîner une modulation de la sécrétion ou de l'activation de deux MMP majeures, la proMMP-2 (gélatinase A, 72 kDa) et la proMMP-9 (gélatinase B, 92 kDa), par les NHDF après 2 jours de culture. Pour cela, la technique de zymographie, qui consiste en une séparation électrophorétique des protéines dans un gel SDS-PAGE contenant 0,1 % de gélatine, a été réalisée à partir des milieux conditionnés de fibroblastes. L'analyse zymographique révèle que la présence d'Elactiv' dans le milieu de culture des NHDF entraîne la présence de la proMMP-2 avec une légère augmentation en dose réponse, mais pas celle de sa forme active (**Figure 60**). En revanche, aucune forme de la MMP-9 n'a pu être observée dans les fibroblastes sains traités ou non par Elactiv'. Il serait maintenant intéressant de savoir si cette légère augmentation de la proMMP-2, en présence d'Elactiv', peut conduire à une augmentation de l'expression de la MMP-2, dans des conditions spécifiques à son activation.

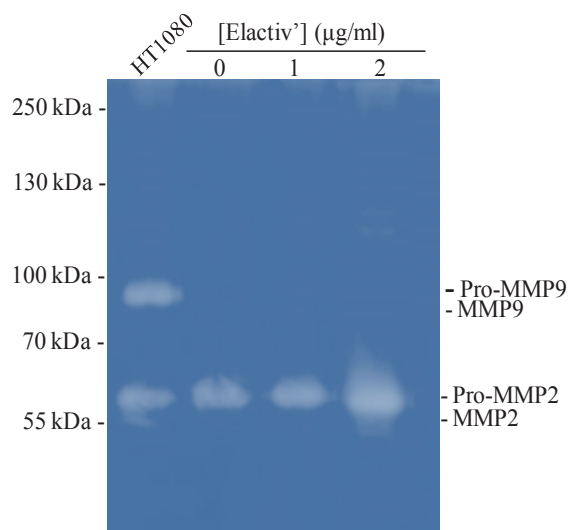


Figure 60: Influence de la protéine Elactiv' sur la sécrétion des gélatinases matricielles.

Analyse par zymographie des activités gélatinolytiques à partir des milieux conditionnés de fibroblastes dermiques humains, cultivés pendant 48h avec 1 et 2 µg/ml d'Elactiv'. Le témoin positif correspond à du milieu conditionné de la lignée de fibrosarcome humain HT1080 exprimant la pro-MMP-2 et la pro-MMP-9 (n=1).

I.3.5. Cinétique de dégradation de la protéine Elactiv' par les MMP-2 et MMP-12

Après avoir observé une légère augmentation de la proMMP-2 en présence de la protéine Elactiv', nous avons voulu savoir si cette enzyme pouvait conduire à une dégradation d'Elactiv', pouvant mettre en exergue une potentielle boucle de rétrocontrôle. Pour cela, une cinétique de dégradation d'Elactiv' par la MMP-2 (**Figure 61.A**) a été réalisée avec la tropoélastine humaine recombinante (hTE) comme témoin positif (**Figure 61.B**). Après 0, 60 et 120 minutes, les réactions ont été arrêtées en ajoutant 10 mM d'EDTA, un agent chélateur, qui inhibe l'activité de la MMP-2.

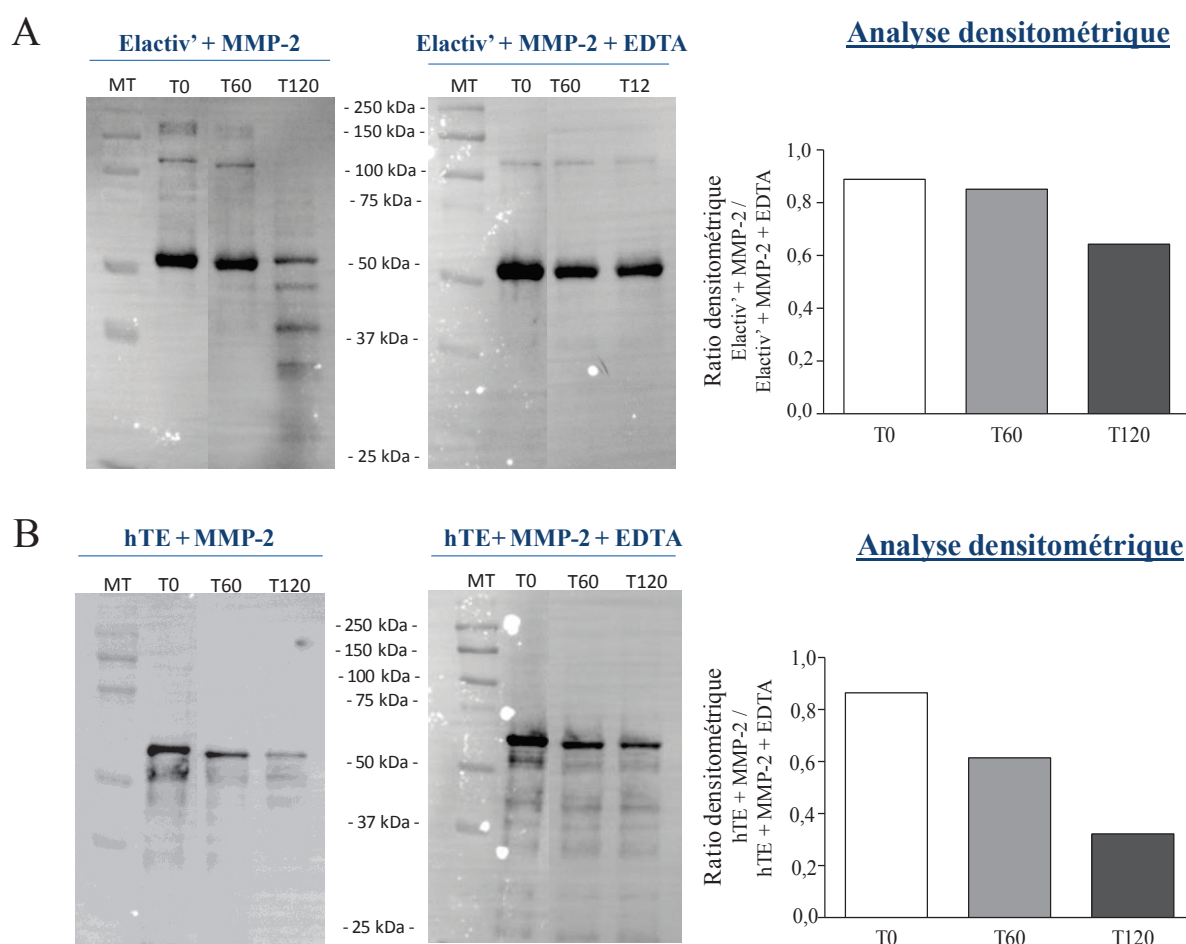


Figure 61 : Cinétique de dégradation de la protéine Elactiv' par la MMP-2. Elactiv' (A) et hTE (B), comme contrôle positif, sont incubés à 30°C en présence de 5 µg/ml de MMP-2 seule ou en combinaison avec 10 mM d'EDTA. Après 0, 60 et 120 minutes, les réactions sont arrêtées en ajoutant 10 mM EDTA. La capacité de la MMP-2 à dégrader Elactiv' et hTE est évaluée par analyses par western blot en utilisant un anticorps anti- α élastine polyclonal spécifique de l'élastine et d'Elactiv'. Les résultats obtenus pour Elactiv' (A) et hTE (B) sont normalisés avec la condition « + 10 mM d'EDTA », puis quantifiés par analyse densitométrique à l'aide du logiciel Image J (n=1).

La capacité de la MMP-2 à dégrader Elactiv' et hTE a été évaluée par analyses par western blot en utilisant un anticorps anti- α élastine, spécifique des deux protéines. Les résultats révèlent qu'Elactiv' est 2,3 fois moins dégradée au cours du temps qu'hTE, soulignant une certaine stabilité de la protéine Elactiv' comme il sera discuté ultérieurement.

Par ailleurs, la MMP-12 est une MMP reconnue pour cliver *in vitro* au moins 89 sites dans la tropoélastine humaine tels que les motifs VGVAPG (Heinz, Jung *et al.* 2010), présents notamment dans la séquence de la protéine Elactiv'. C'est la raison pour laquelle, nous avons décidé d'étudier la susceptibilité d'Elactiv' à être dégradée par la MMP-12 par une cinétique de dégradation (**Figure 62.A**), réalisée comme décrit précédemment, toujours avec hTE comme témoin positif (**Figure 62.B**). Les résultats indiquent qu'Elactiv' est dégradée au cours du temps par la MMP-12 de façon similaire à hTE.

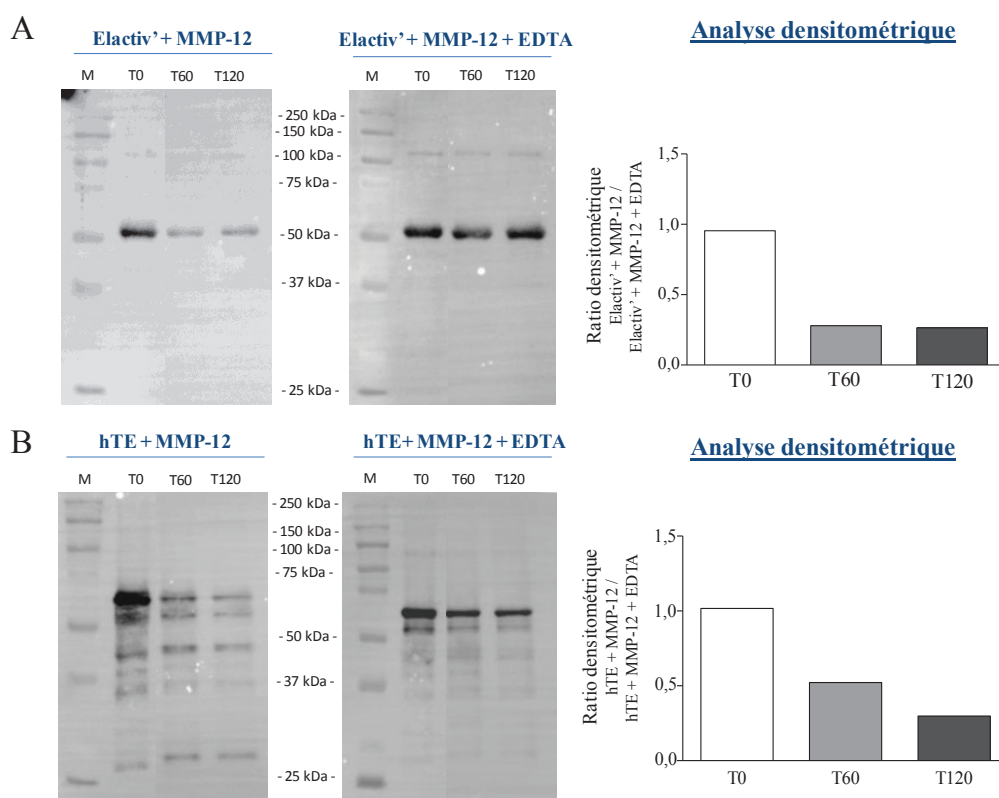


Figure 62: Cinétique de dégradation de la protéine Elactiv' par la MMP-12. Elactiv' (A) et hTE (B), comme contrôle positif, sont incubés à 30°C en présence de 5 µg/ml de MMP-12 seule ou en combinaison avec 10 mM d'EDTA. Après 0, 60 et 120 minutes, les réactions sont arrêtées en ajoutant 10 mM EDTA. La capacité de la MMP-12 à dégrader Elactiv' et hTE est évaluée par analyses par western blot en utilisant un anticorps anti- α élastine polyclonal spécifique de l'élastine et d'Elactiv'. Les résultats obtenus pour Elactiv' (A) et hTE (B) sont normalisés avec la condition « + 10 mM d'EDTA », puis quantifiés par analyse densitométrique à l'aide du logiciel Image J (n=1).

I.3.6. Incorporation de la protéine Elactiv' dans les fibres élastiques néo-synthétisées

Après avoir démontré que la protéine Elactiv' conserve les propriétés d'auto-assemblage similaires à hTE, qu'elle est biocompatible et qu'elle conserve les mêmes fonctions biologiques que la protéine native (à savoir la prolifération et l'adhérence cellulaire, la dégradation par la MMP-12), nous avons voulu savoir si Elactiv', tout comme la TE, est capable *in vitro* de former des structures fibrillaires et de s'incorporer dans les fibres élastiques néo-synthétisées.

Pour répondre à cette question, cinq jours après la confluence des NHDF, Elactiv' a été ajoutée dans le milieu de culture suivant une gamme de concentration variant de 0,5 à 10 µg/ml. La protéine Elactiv' a été laissée en contact avec les fibroblastes pendant 3 jours. Huit jours post-confluence, une immunofluorescence a été réalisée en utilisant un anticorps anti-FLAG (rouge), dirigé contre l'étiquette FLAG présente à l'extrémité N-terminale d'Elactiv', et un anticorps polyclonal anti- α élastine (vert) reconnaissant à la fois Elactiv' et TE. L'imagerie en épifluorescence révèle qu'Elactiv' et les fibres de TE néo-synthétisées forment des structures superposables, signifiant que la protéine Elactiv' est potentiellement incorporée au sein des fibres pré-existantes (**Figure 63. F-G, J-K, N-O**). Néanmoins une analyse par microscopie confocale permettrait de définir plus précisément s'il s'agit d'une réelle co-localisation de ces entités. De plus, de petits agrégats d'Elactiv' sont également visibles au sein de la MEC, dont la taille apparaît augmenter en fonction de la concentration en protéine dans le milieu de culture. Lorsque la concentration atteint 10 µg/ml, Elactiv' n'apparaît plus incorporée dans les fibres élastiques néo-synthétisées. Seuls de gros agrégats d'Elactiv' sont visibles (**Figure 63. R-S**).

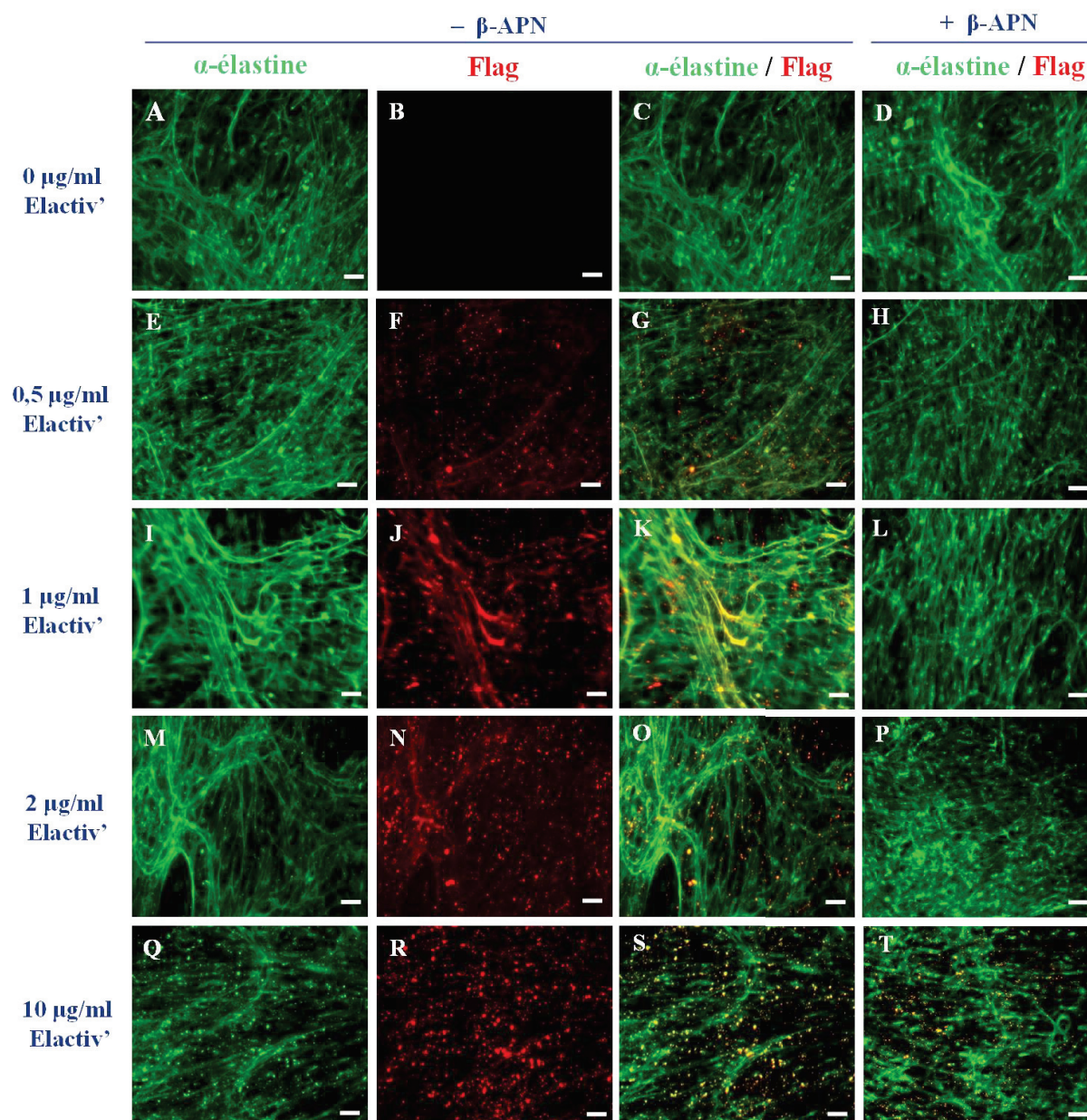


Figure 63: Incorporation de la protéine Elactiv' dans les dépôts fibrillaires de tropoélastine néo-synthétisés par les fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF).

La protéine Elactiv', +/- 350 μ M de β -APN (inhibiteur de l'activité LOX)), est ajoutée en solution dans le milieu de culture des NHDF à J5 post-confluence suivant différentes concentrations : 0 μ g/ml, 0,5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml et 10 μ g/ml. A J8 post-confluence, les dépôts fibrillaires de tropoélastine néo-synthétisés ainsi qu'Elactiv' sont marqués par immunofluorescence grâce à l'anticorps anti α -élastine polyclonal, spécifique de la tropoélastine et d'Elactiv'. De plus, l'anticorps anti-FLAG, dirigé contre l'étiquette FLAG présente à l'extrémité N-terminale d'Elactiv', permet de ne marquer que la protéine Elactiv'. Observation au microscope à épifluorescence Axioplan Imaging (Zeiss). Barre d'échelle = 20 μ m, (n=3).

Pour savoir si l'incorporation de la protéine Elactiv' au sein des fibres de TE néo-synthétisées est dépendante de l'activité de la lysyl oxydase (LOX), nous avons ajouté un inhibiteur pharmacologique de la LOX, le β -(γ -glutamyl)-aminopropionitrile (β -APN), à une concentration de 350 μ M dans le milieu de culture des NHDF, selon le même protocole que décrit précédemment et en combinaison avec Elactiv'. Ce composé chimique se fixe de manière compétitive dans le site catalytique de la LOX (Tang, Trackman *et al.* 1983). Un mécanisme a été proposé : le β -APN réagit comme les substrats de LOX, en formant une base de Schiff sans qu'il y ait la libération du produit aldéhydique. Ceci entraîne un blocage du site actif et une inhibition irréversible de l'activité lysyl oxydase (Finney, Moon *et al.* 2014).

Les immunofluorescences, réalisées trois jours après l'ajout du β -APN dans le milieu de culture des NHDF, révèlent toujours la présence des fibres de TE qui se sont accumulées pendant les cinq jours précédant le traitement (**Figure 63. D, H, L, P et T**). En revanche, Elactiv' n'est plus incorporée au sein des fibres élastiques quelle que soit sa concentration. Les petits agrégats de protéine ont également disparus pour les faibles concentrations en Elactiv' (0,5- μ g/ml), mais sont toujours présents, en plus faible quantité et intensité, lorsque la concentration en Elactiv' atteint 10 μ g/ml (**Figure 63.T**) Ces résultats démontrent que l'activité de la LOX est nécessaire d'une part à l'intégration d'Elactiv' dans les fibres de TE préformées, et d'autre part pour la formation des agrégats d'Elactiv'.

En conclusion, la protéine Elactiv' est susceptible, à faible concentration, de s'incorporer au sein des fibres élastiques néo-synthétisées et de former de petits agrégats au sein de la MEC, grâce notamment à l'activité de la LOX.

I.4. Caractérisation de la protéine Elactiv' comme support pour la culture 2D de kératinocytes humains

Après avoir caractérisé la protéine Elactiv' comme support pour la culture de fibroblastes dermiques humains, et dans la perspective de développer un substitut cutané, nous avons décidé de caractériser Elactiv' comme support pour la culture des cellules humaines de l'épiderme : les kératinocytes.

I.4.1. Etude du potentiel progéniteur des kératinocytes

Dans un premier temps, nous avons étudié le potentiel progéniteur des kératinocytes primaires humains (NHK) cultivés sur des surfaces fonctionnalisées avec la protéine Elactiv'. Pour cela, nous avons évalué la capacité des cellules à se diviser et à former des colonies, en présence d'Elactiv', après trois générations de douze jours de culture chacune. Le contrôle correspond au plastique brut (**Figure 64.A**). Le nombre et la taille des colonies ont été quantifiés selon la méthode de Stachelscheid (Stachelscheid, Ibrahim *et al.* 2008) qui classe les colonies en trois catégories : petites ($<1 \text{ mm}^2$), moyennes ($1-2 \text{ mm}^2$) et grandes colonies ($>2 \text{ mm}^2$). Après une première génération, les kératinocytes cultivés sur Elactiv' présentent 55 ± 12 de grandes colonies, 30 ± 9 de colonies moyennes et 11 ± 4 de petites colonies, comparé au contrôle qui affiche 56 ± 13 , 10 ± 4 et 10 ± 6 pour les grandes, moyennes et petites colonies respectivement (**Figure 64.B**). Hormis le nombre de colonies moyennes, qui est significativement plus important en présence d'Elactiv', le nombre des grandes et petites colonies est quasiment identique pour les deux conditions. Les 2^{ème} et 3^{ème} générations révèlent un phénotype plus marqué et différent entre les cellules cultivées sur Elactiv' et celles cultivées sur le plastique brut. Après deux générations, les cellules cultivées sur Elactiv' présentent 67 ± 11 de grandes colonies, 8 ± 5 de colonies moyennes et 1 ± 2 de petites colonies, comparé au contrôle qui affiche 87 ± 11 , 22 ± 5 et 5 ± 1 pour les grandes, moyennes et petites colonies respectivement. Une baisse du potentiel progéniteur des kératinocytes est ainsi observée en présence d'Elactiv' et se confirme pour la 3^{ème} génération où le nombre de grandes colonies est moins important en présence de la protéine Elactiv' (36 ± 3) comparé au contrôle (50 ± 2). Un nombre quasi négligeable de colonies moyennes est observé en présence d'Elactiv' (1 ± 1) contrairement au contrôle où elles sont absentes. Les petites colonies sont absentes pour les deux conditions. En conclusion, la clonogénicité des kératinocytes primaires humains est diminuée au contact de la protéine Elactiv'. Cela pourrait s'expliquer par une entrée plus précoce en différenciation.

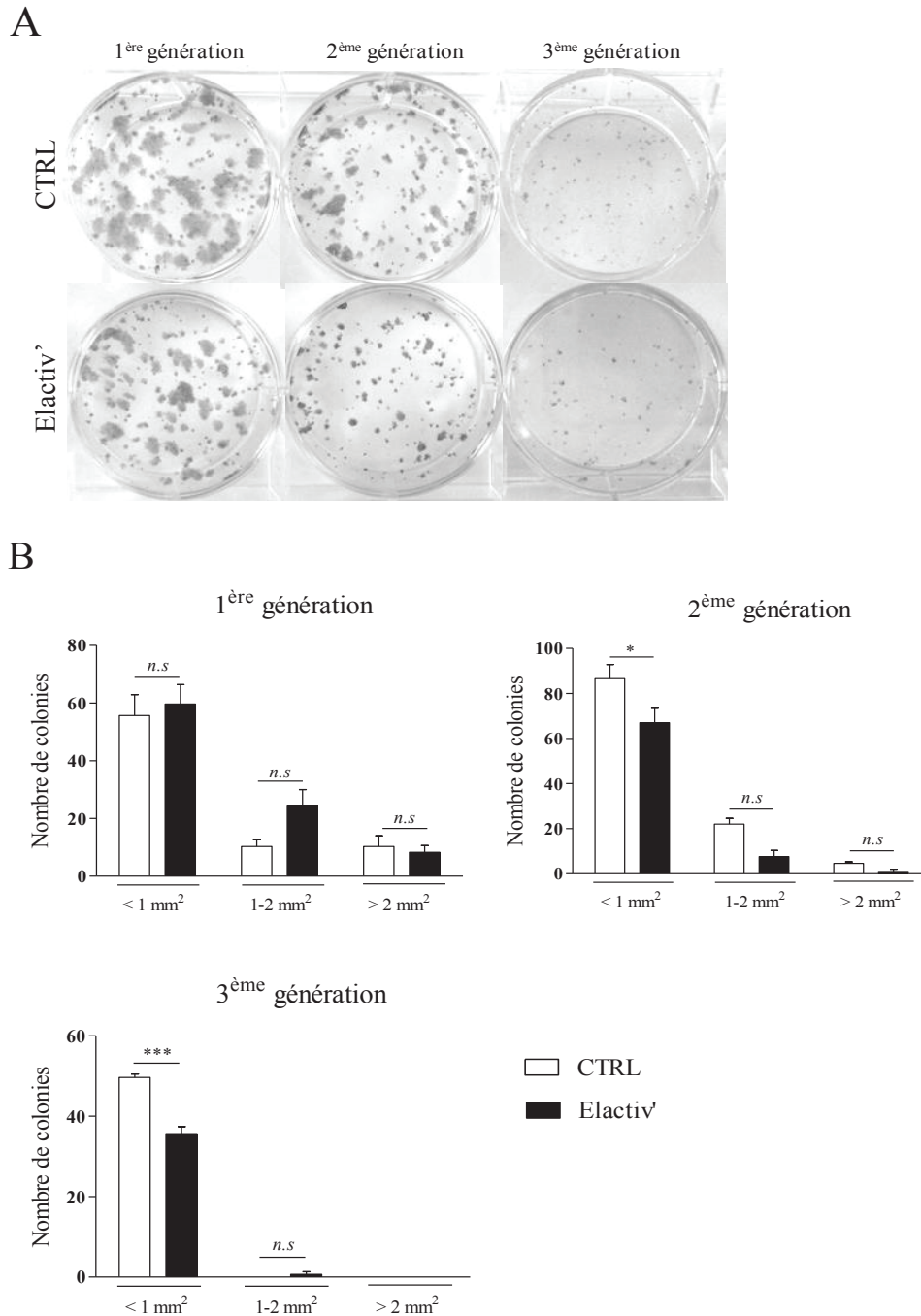


Figure 64: Effet de la protéine Elactiv' sur le potentiel progéniteur des Kératinocytes primaires humains. A/ Etude de la capacité des kératinocytes à se diviser et à former des colonies (« Colony Forming Efficiency ») sur des surfaces préalablement fonctionnalisées avec 20 µg/ml d'Elactiv'. Le contrôle (CTRL) correspond à la plaque brute. B/ Quantification du nombre et de la taille des colonies visualisées en (A) selon la méthode de Stachelscheid (Stachelscheid, Ibrahim et al. 2008) qui classe les colonies en trois catégories : petites (<1mm²), moyennes (1-2 mm²) et grandes colonies (>2mm²). Les données représentent la moyenne ± SEM (n=3). Une ANOVA à deux facteurs suivie d'un post test Bonferroni est effectuée pour la détermination des valeurs de p, *** $p < 0,001$; * $p < 0,1$; n.s non significatif.

I.4.2. Etude de la différenciation précoce des kératinocytes

Après avoir observé une baisse du potentiel progéniteur des kératinocytes, cultivés sur des surfaces fonctionnalisées avec Elactiv', nous avons voulu savoir si ce phénomène s'accompagnait d'une induction de la différenciation précoce des kératinocytes. Des marqueurs de prolifération, Ki67, et de différenciation tels que la kératine-10 (K10), la transglutaminase-1 (TGM1) et l'involucrine (IVL) ont donc été suivis par PCR en temps réel. Le niveau d'expression relatif de chaque gène a été calculé par normalisation sur l'expression du gène de référence RPL13A. Le contrôle correspond au plastique nu. Les résultats indiquent que la protéine Elactiv' n'induit pas de différence significative sur les profils d'expression des différents marqueurs relativement au contrôle (**Figure 65**). Le marqueur de prolifération Ki67 présente une diminution progressive du niveau d'expression de son ARNm à partir du moment où la confluence est atteinte (jour 0), indiquant l'arrêt de prolifération des kératinocytes. Parallèlement, l'expression de l'ARNm du marqueur de différenciation précoce K10 est induite deux jours suivant la confluence. La transglutaminase-1 indique une augmentation progressive de l'expression de son ARNm dès la confluence, toutefois selon une intensité d'induction plus modérée que K10, avec une diminution quatre jours suivant la confluence. Enfin, l'involucrine présente une augmentation progressive de l'expression de son ARNm deux jours après la confluence avec une plus forte intensité d'induction que la transglutaminase-1.

En conclusion, la baisse du potentiel progéniteur des kératinocytes primaires humains au contact de la protéine Elactiv', ne s'accompagne pas d'une entrée plus précoce en différenciation.

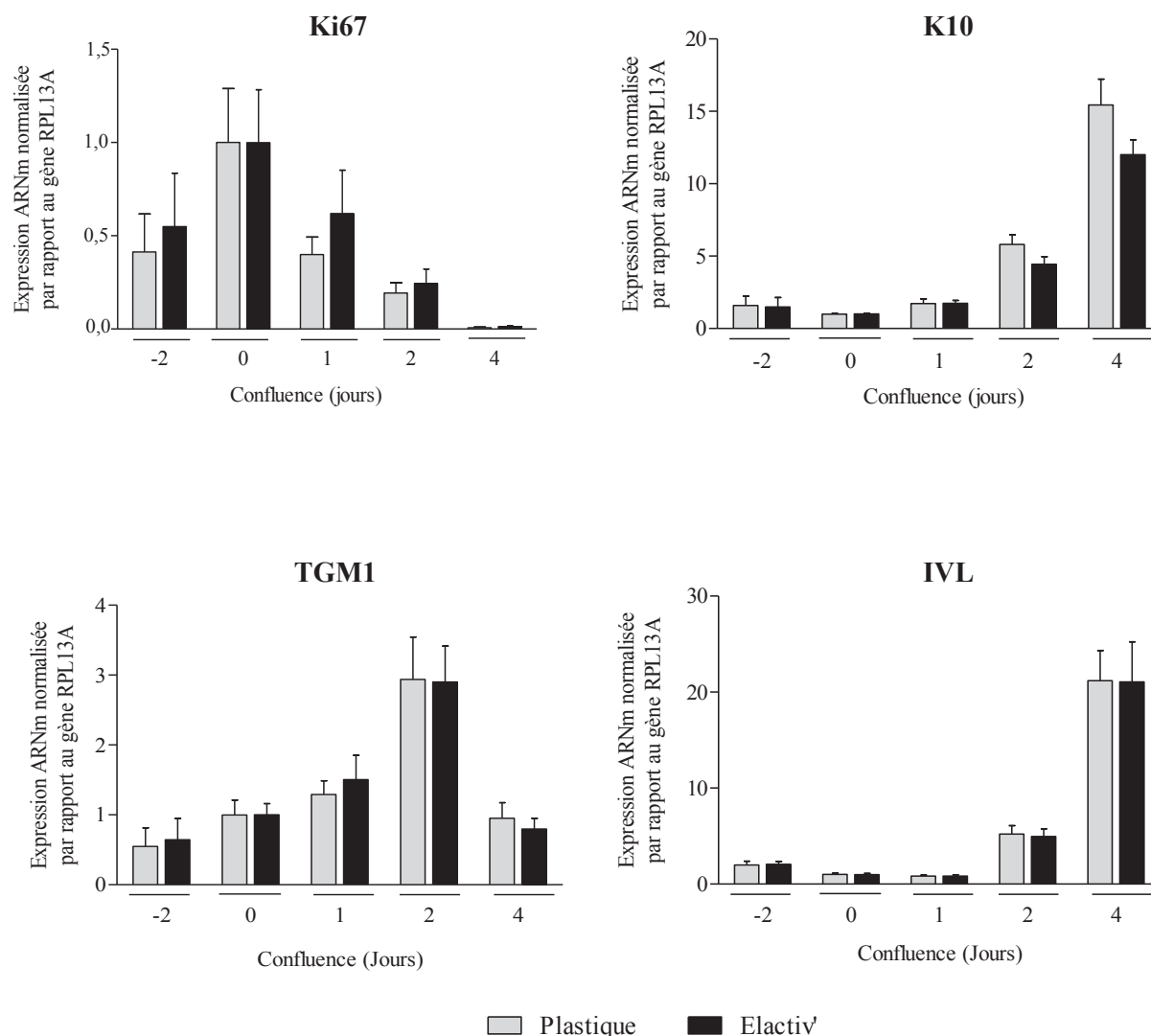


Figure 65: Suivi de l'induction de la différenciation précoce dans un modèle de culture à confluence de kératinocytes primaires humains en présence de la protéine Elactiv'.

Les kératinocytes primaires humains sont ensemencés à une densité de $4 \cdot 10^4$ cellules/cm² dans du milieu complet, sur des surfaces préalablement fonctionnalisées avec 0,1 µg/ml d'Elactiv'. La différenciation est induite à confluence dans du milieu standard sans facteurs de croissances. Les cellules sont récoltées 2 jours avant la confluence (-2, correspondant à environ 70% de confluence), à confluence (0), un jour (1), deux jours (2) et 4 jours (4) après confluence. L'expression relative des ARNm Ki67, K10, transglutaminase 1 (TGM1) et involucrine (IVL) est analysée par RT-PCR en temps réel. Le niveau d'expression relatif de chaque gène est calculé par normalisation sur l'expression du gène de référence RPL13A. Les résultats représentent la moyenne d'induction \pm SEM rapportée au niveau d'expression à confluence (0) de trois expériences indépendantes. Une ANOVA à deux facteurs suivie du post test Bonferroni, avec comme référence le plastique, n'a pas permis de déterminer de différences significatives entre les conditions.

II. Application de la protéine Elactiv' au syndrome de Williams-Beuren

II.1. Induction d'un dépôt fibrillaire de tropoélastine dans les cellules Williams-Beuren

Après avoir démontré, dans la section I.3.6, qu'Elactiv' était capable de renforcer *in vitro* les fibres de TE néo-synthétisées par des fibroblastes sains, nous avons cherché à connaître l'effet de la protéine Elactiv' sur des fibroblastes pathologiques, qui ne synthétisent pas ou très peu de fibres élastiques *in vitro*, à savoir les fibroblastes dermiques de patients atteints du syndrome de Williams-Beuren (WB). Ce syndrome est caractérisé par une microdélétion résultant de la suppression hémizygote de 1,5 à 1,8 Mb du locus q11.23 du chromosome 7. Cette région englobe entre 26 et 28 gènes contigus dont celui de l'élastine, aboutissant à la perte d'un des allèles de l'élastine (Schubert 2009). Par conséquent, nous avons voulu savoir si Elactiv' est capable de compenser ou de réinduire *in vitro* la synthèse de TE fibrillaire par les cellules de patients WB.

Pour cela, le même protocole, que celui utilisé pour démontrer l'incorporation d'Elactiv' dans les fibres de TE néo-synthétisées par les fibroblastes sains, a été appliqué. Cinq jours après la confluence des cellules WB (souche G371) et de leur contrôle apparié (souche P068), Elactiv' a été ajoutée dans le milieu de culture suivant une gamme de concentration variant de 0,5 à 2 µg/ml. Huit jours post-confluence, les fibres de TE néo-synthétisées ainsi que la protéine Elactiv' ont été marquées par immunofluorescence. Contrairement au contrôle (fibroblastes sains), où l'on observe l'incorporation d'Elactiv' dans les fibres de TE pré-existantes (**Figure 66. C et E**), le traitement des cellules WB avec Elactiv' n'induit pas la synthèse d'un dépôt fibrillaire de tropoélastine (**Figure 66. D et F**). Néanmoins, de petits agrégats d'Elactiv', dont la formation nécessite l'activité de LOX comme démontré dans la section I.3.6, sont capables de se former en présence des cellules WB (**Figure 66.F**).

Suite à ces observations, nous avons décidé d'ajouter Elactiv' dans le milieu de culture des fibroblastes WB à confluence. Lorsque les cellules atteignent la confluence, le mécanisme d'inhibition de contact stoppe la prolifération des fibroblastes favorisant la synthèse et la sécrétion de protéines matricielles, en particulier les protéines qui participent à l'assemblage des fibres élastiques dans le derme. Par conséquent, l'ajout d'Elactiv' à ce moment particulier de la vie de la cellule pourrait optimiser les chances d'induire le processus d'élastogénèse.

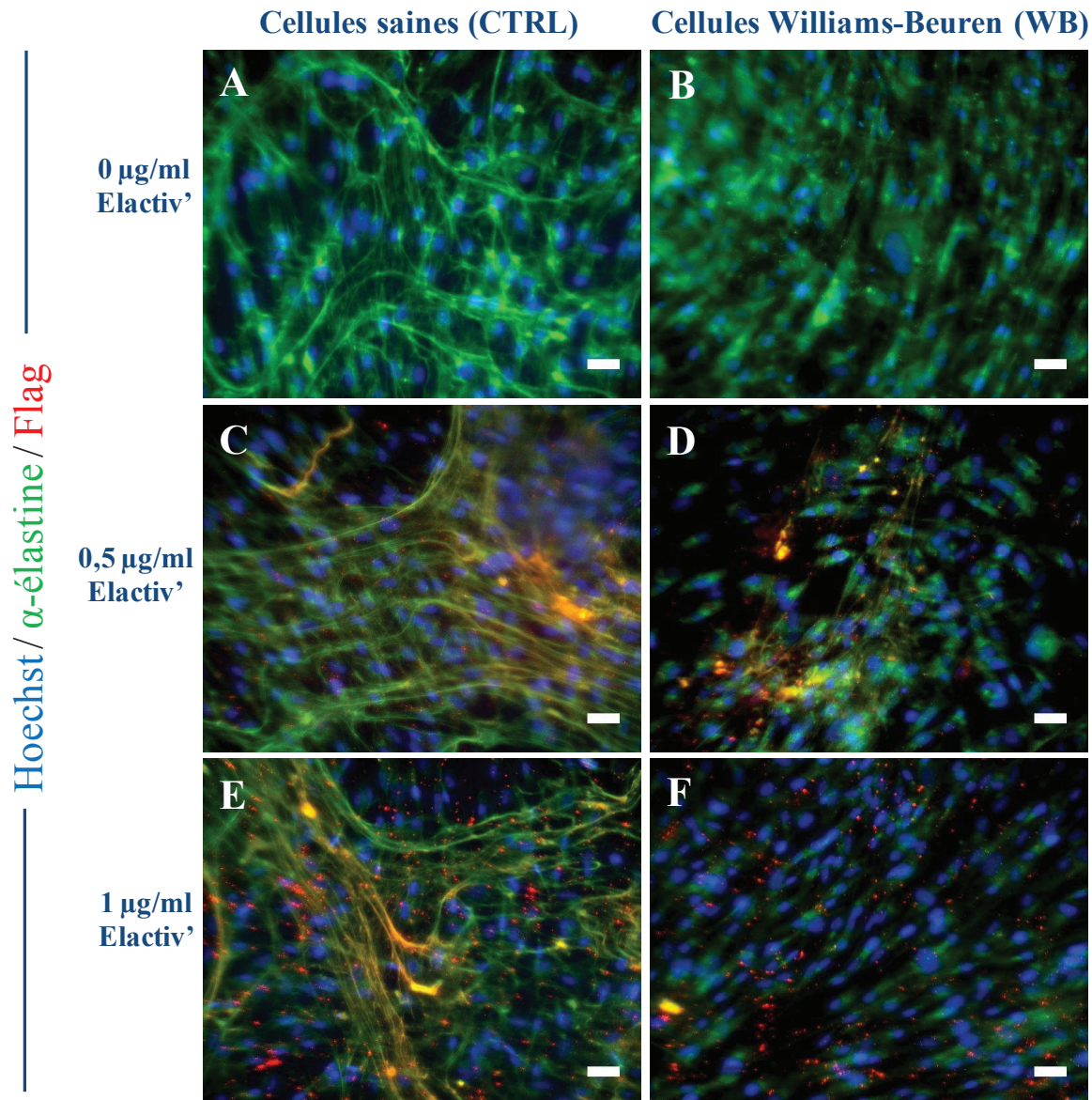


Figure 66: Traitement des cellules Williams-Beuren (souche G371, WB) et leur contrôle apparié (souche P068, CTRL) avec la protéine Elactiv' à J5 post-confluence. Elactiv' est ajoutée en solution dans le milieu de culture à J5 post-confluence, suivant différentes concentrations : 0 µg/ml, 0,5 µg/ml et 1 µg/ml. A J8 post-confluence, les dépôts fibrillaires de tropoélastine néo-synthétisés ainsi qu'Elactiv' sont marqués par immunofluorescence grâce à l'anticorps anti α-élastine polyclonal, spécifique de la tropoélastine et d'Elactiv'. De plus, l'anticorps anti-FLAG, dirigé contre l'étiquette FLAG présente à l'extrémité N-terminale d'Elactiv', permet de ne marquer que la protéine Elactiv'. Les noyaux sont colorés au Hoechst. Observation au microscope à épifluorescence Axioplan Imaging (Zeiss). Barre d'échelle = 20 µm, (n=3).

Ainsi, à confluence, Elactiv' a été ajoutée dans le milieu de culture des fibroblastes WB et de leur contrôle apparié, suivant une gamme de concentration variant de 0,5 à 2 µg/ml. Le milieu de culture a été changé tous les deux jours sans ajout supplémentaire d'Elactiv', afin d'éviter l'induction d'une potentielle boucle de rétrocontrôle. À dix-sept jours post-confluence, les fibres de TE néo-synthétisées ainsi que la protéine Elactiv' ont été marquées par immunofluorescence. Contrairement aux cellules WB non traitées (témoin négatif), qui ne synthétisent pas de fibres élastiques en conditions *in vitro* (**Figure 67.B**), les cellules WB traitées avec Elactiv' synthétisent des dépôts fibrillaires de TE, et ce quelle que soit la concentration initiale d'Elactiv' dans le milieu de culture des fibroblastes (**Figure 67.D, F et H**). Les cellules WB retrouvent un phénotype similaire au contrôle sain apparié.

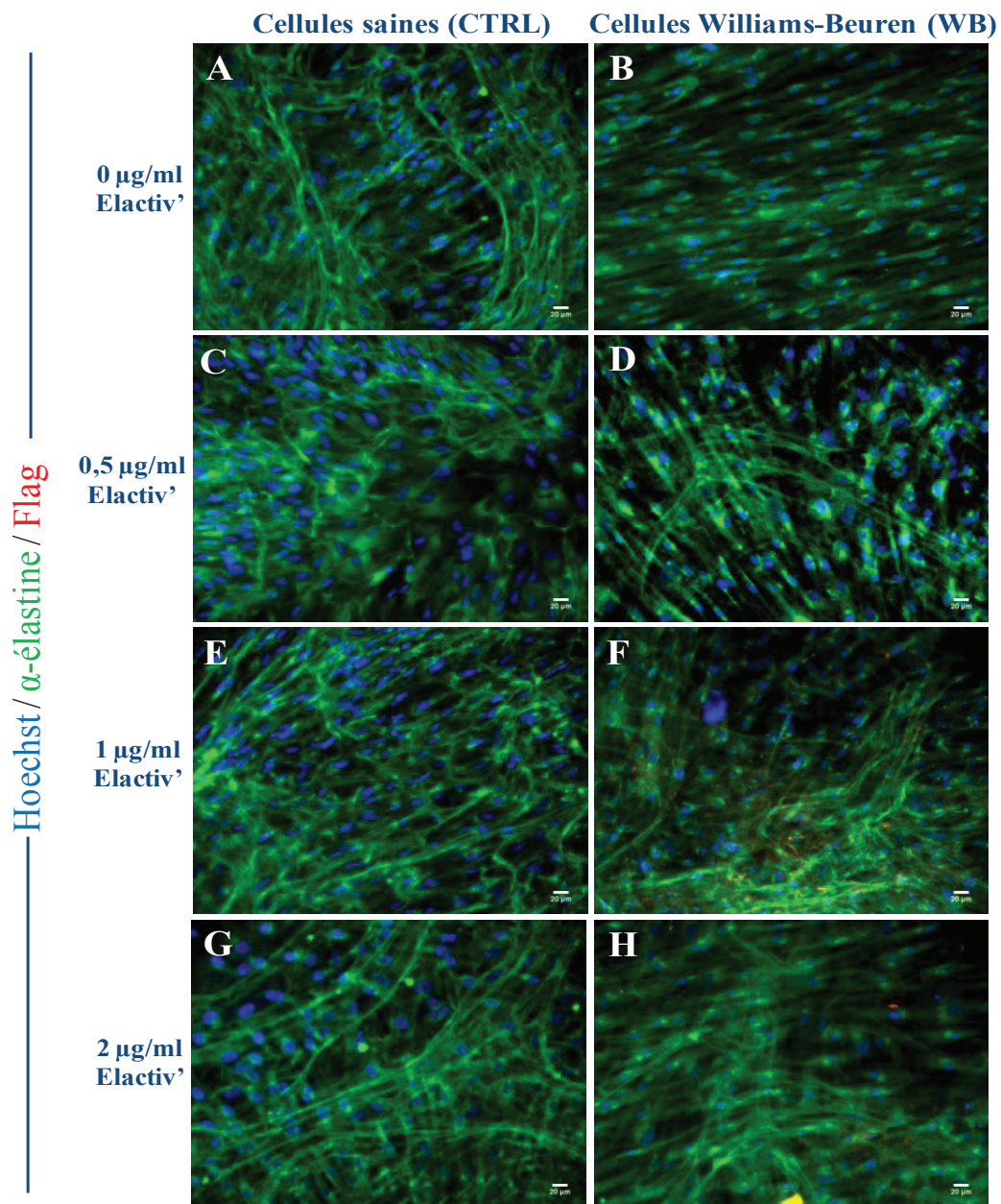


Figure 67: Traitement des cellules Williams-Beuren (souche G371, WB) et leur contrôle apparié (souche P068, CTRL) avec la protéine Elactiv' à confluence. La protéine Elactiv' est ajoutée en solution dans le milieu de culture des cellules à confluence, suivant différentes concentrations : 0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml et 2 µg/ml. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours sans Elactiv'. A J17 post-confluence, les dépôts fibrillaires de tropoélastine néo-synthétisés ainsi qu'Elactiv' sont marqués par immunofluorescence grâce à l'anticorps anti α -élastine polyclonal, spécifique de Ila tropoélastine et d'Elactiv'. De plus, l'anticorps anti-FLAG, dirigé contre l'étiquette FLAG présente à l'extrémité N-terminale d'Elactiv', permet de ne marquer que la protéine Elactiv'. Les noyaux sont colorés au Hoechst. Observation au microscope à épifluorescence Axioplan Imaging (Zeiss). Barre d'échelle = 20 µm, (n=3).

De plus, l'analyse plus approfondie des photos où seule la protéine Elactiv' est marquée révèle la présence de petits agrégats écartés les uns des autres, mais dont l'ensemble retrace la forme et la trajectoire des dépôts fibrillaires de TE (**Figure 68**). Par conséquent, Elactiv' semble jouer un rôle prépondérant dans le dépôt fibrillaire de TE par les cellules WB, comme si elle était à l'initiative d'un processus de polymérisation.

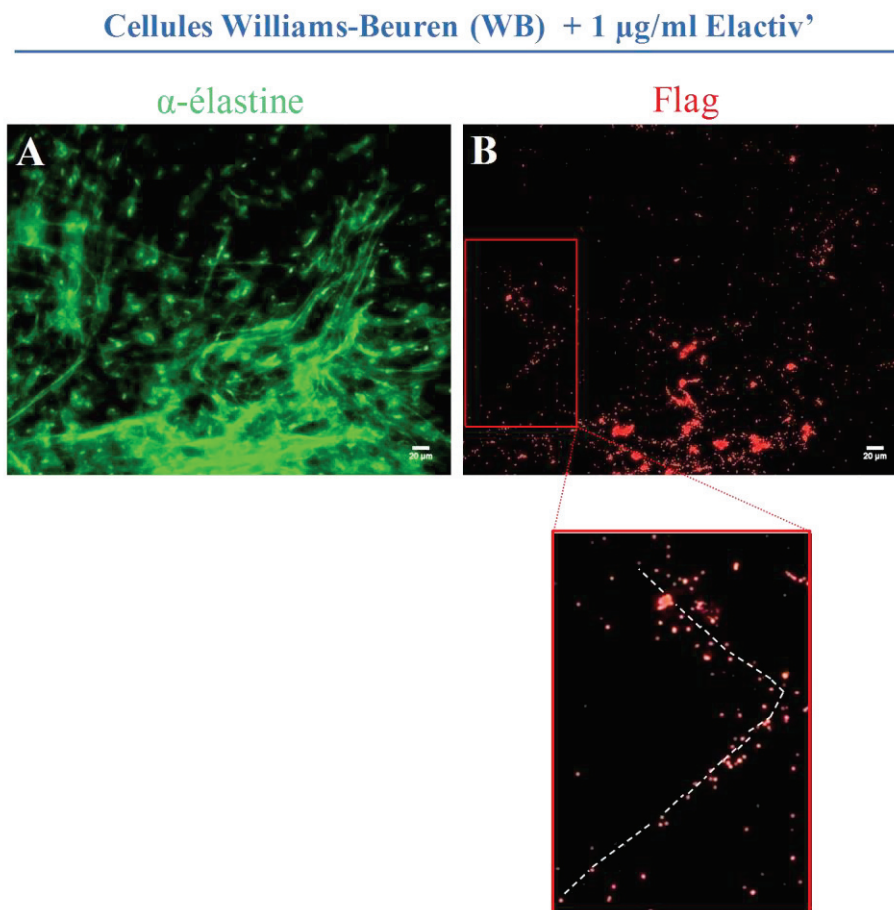


Figure 68: Rôle de la protéine Elactiv' dans le dépôt fibrillaire de TE par les cellules Williams-Beuren. Les dépôts fibrillaires de tropoélastine sont immunomarqués avec l'anticorps anti α -élastine tandis qu'Elactiv' est marquée avec l'anticorps anti-FLAG.

II.2. Profil d'expression génique des cellules Williams-Beuren traitées avec Elactiv'

Suite à ces observations, afin de rechercher si la néo-synthèse de matériel élastique dans les cellules WB traitées avec Elactiv' pouvait être la conséquence d'une induction génique, nous avons suivi l'expression de gènes, codant pour des protéines qui participent à l'assemblage des fibres élastiques, par PCR en temps réel. Par ailleurs, nous voulions également savoir si l'assemblage d'Elactiv', au sein des dépôts fibrillaires de TE et sous forme de petits agrégats réticulés, nécessite un contact cellulaire via les molécules transmembranaires dont l'EBP. Par conséquent, nous avons étudié l'expression génique des cellules WB traitées avec Elactiv' en présence d'un inhibiteur de l'EBP, le L-lactose. L'hexapeptide hydrophobe VGVAPG a été utilisé dans cette expérience en tant que contrôle positif.

Après avoir préalablement mis les cellules WB confluentes au repos, dans un milieu sans sérum (dans le but d'éliminer les facteurs de croissance susceptibles de biaiser l'analyse génique), Elactiv' et l'hexapeptide VGVAPG ont été ajoutés dans le milieu de culture à une concentration de 2 µg/ml, ± 10 mM de L-lactose. Les cellules ont été cultivées 24h et 48h après la confluence avant l'extraction et l'analyse du niveau des transcrits : ELN (élastine), FBLN5 (fibuline-5), FBN1 (fibrilline-1), FBN2 (fibrilline-2), LOX (lysyl oxydase). L'expression du gène de la MMP-1 (métalloprotéinase matricielle) a également été évaluée pour déterminer si la présence d'Elactiv' entraîne une augmentation de son expression, observée en présence de l'hexapeptide VGVAPG dans des cultures de fibroblastes sains (Brassart, Fuchs *et al.* 2001).

Les analyses révèlent que le niveau d'expression d'ELN, de la FBN2 et de la LOX (compte tenu des écarts-types) ne varie pas de façon significative dans les cellules WB traitées avec Elactiv' et l'hexapeptide VGVAPG, comparé aux cellules non traitées (**Figure 69**). Néanmoins, une tendance à l'augmentation de la FBLN5 et de la FBN1 est observée à T48h en présence d'Elactiv'. Cette tendance ne se retrouve pas en présence de L-lactose indiquant un effet spécifique des agonistes dont il sera discuté ultérieurement. L'expression de la MMP-1 semble diminuer dès T24h en présence d'Elactiv' et de l'hexapeptide VGVAPG.

En conclusion, la présence de la protéine Elactiv' dans le milieu de culture des cellules WB semble entraîner une légère augmentation de l'expression des gènes FBLN5 et FBN1 à T48h. La néo-synthèse de matériel élastique par les cellules WB traitées avec Elactiv' n'est donc pas la conséquence d'une induction des gènes ELN, FBN2 et LOX.

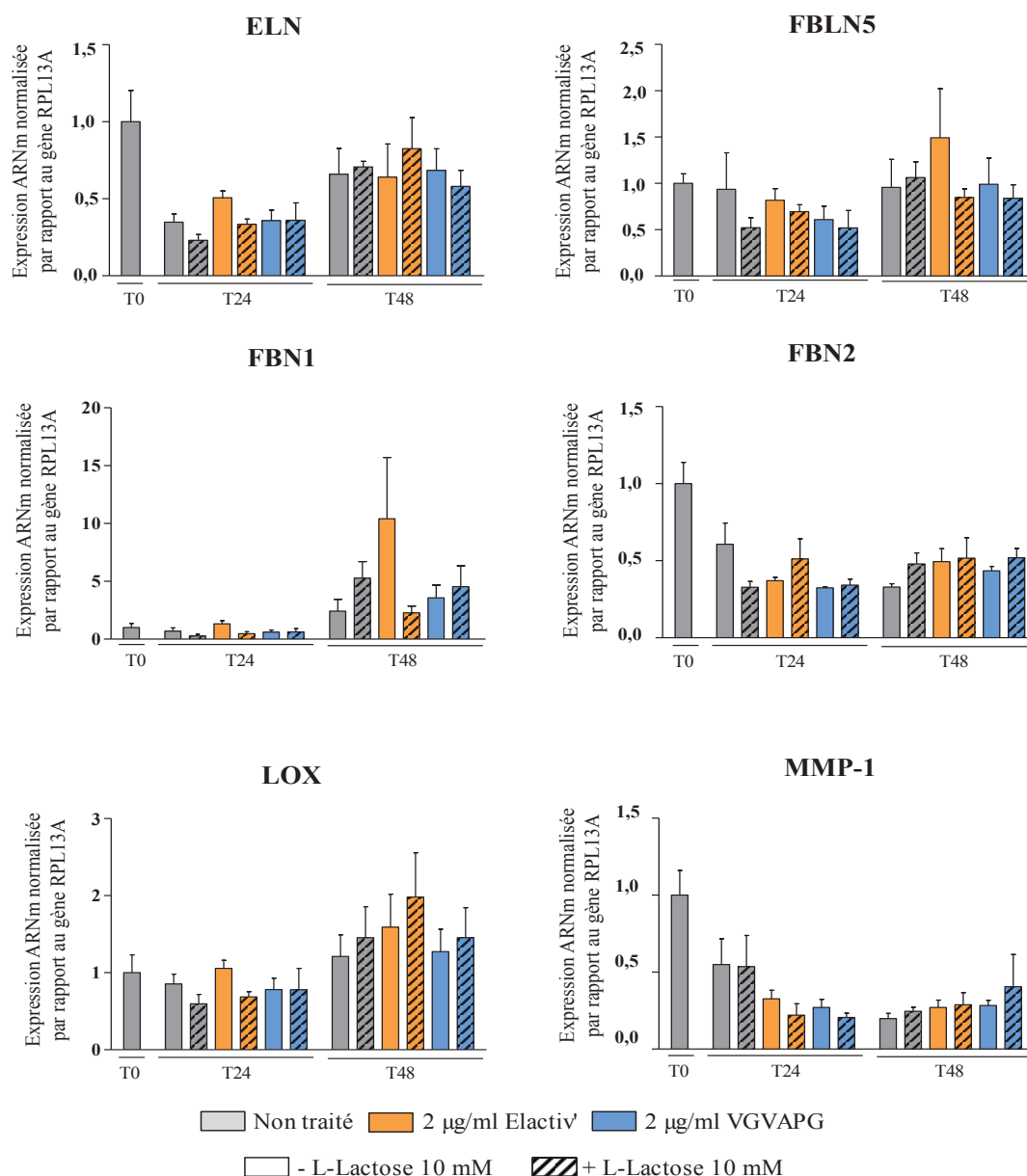


Figure 69: Analyse du profil d'expression génique des cellules Williams-Beuren (WB) traitées avec la protéine Elactiv' par PCR en temps réel. Les cellules WB sont mises au repos dans du milieu sans sérum, 16h avant le début de l'expérience, afin d'éliminer les facteurs de croissance. Une fois la confluence atteinte, Elactiv' et le peptide VGVAPG (peptide de reconnaissance de l'EBP, utilisé ici comme contrôle positif) sont ajoutés dans le milieu de culture à une concentration de 2 µg/ml, ± 10 mM de L-lactose (inhibiteur de l'EBP). Les cellules sont cultivées pendant 24h et 48h avant l'extraction et l'analyse de l'expression relative des ARNm par PCR en temps réel. Une seule expérience a été réalisée avec trois extractions d'ARN indépendantes par condition. Les résultats représentent la moyenne ± SEM du nombre de transcrits, normalisée par rapport au gène RPL13A (n=3). Une ANOVA à deux facteurs suivie du post test Bonferroni, avec comme référence la condition non traitée pour chacun des temps, n'a pas permis de déterminer de différences significatives entre les conditions.

III. Hydrogel Elactiv'

Un des objectifs de ce travail est d'utiliser la protéine Elactiv' pour la constitution d'architectures tridimensionnelles élastiques. Après avoir étudié la protéine de l'échelle moléculaire à l'échelle micrométrique, par des formulations spontanées et labiles (coacervation non covalente), nous nous sommes attachés à faire évoluer l'architecture vers un hydrogel formé exclusivement d'Elactiv' et réticulé par de la génipine, un composé naturel végétal. La génipine a principalement été utilisée en phytothérapie ainsi que dans la création de colorants alimentaire résistants à la chaleur, au pH et à la lumière. Le génipine réagit avec les amines primaires libres donnant une couleur bleue foncée au matériau (Cheng, Estes *et al.* 2013). Cette structure en volume permet d'accéder aux paramètres mécaniques de l'ensemble, mais également d'analyser sa toxicité cellulaire et son innocuité *in vivo* avant de poursuivre avec d'éventuels assemblages plus complexes et hétérogènes.

III.1. Structures réticulées de la protéine Elactiv'

Une solution de la protéine Elactiv' pure a été préparée à une concentration finale de 2 mg/ml dans du PBS puis chauffée pour induire la coacervation. La génipine est ajoutée aux agrégats Elactiv' à une concentration finale de 50 mM. L'analyse des agrégats d'Elactiv', par microscopie électronique à balayage, révèle qu'en présence de génipine, les agrégats d'Elactiv' forment un réseau très dense, où les sphères, en plus d'être interconnectées comme des billes sur une chaîne, forment des structures semblables à des fibres (**Figure 70.A**), avec un diamètre (0,2 μm) similaire à ceux des fibres élastiques *in vivo* (Ushiki 1992). En plus de la coalescence, de nombreux pores se forment. Quand la concentration en Elactiv' atteint 50 mg/ml avec 50 mM de génipine, la plupart des molécules Elactiv' a déjà coalescé pour former un hydrogel poreux (**Figure 70.B**). Notons que les pores ainsi formés s'étendent de 1 à 5 μm . Cette taille en théorie ne permet pas la colonisation passive (sans dégradation du gel) des cellules mésenchymateuses à travers cette architecture. Une petite quantité de sphères Elactiv' peut encore être observée à la surface de l'hydrogel, mais également au sein des pores. Par conséquent, un réseau 3D synthétique s'est formé.

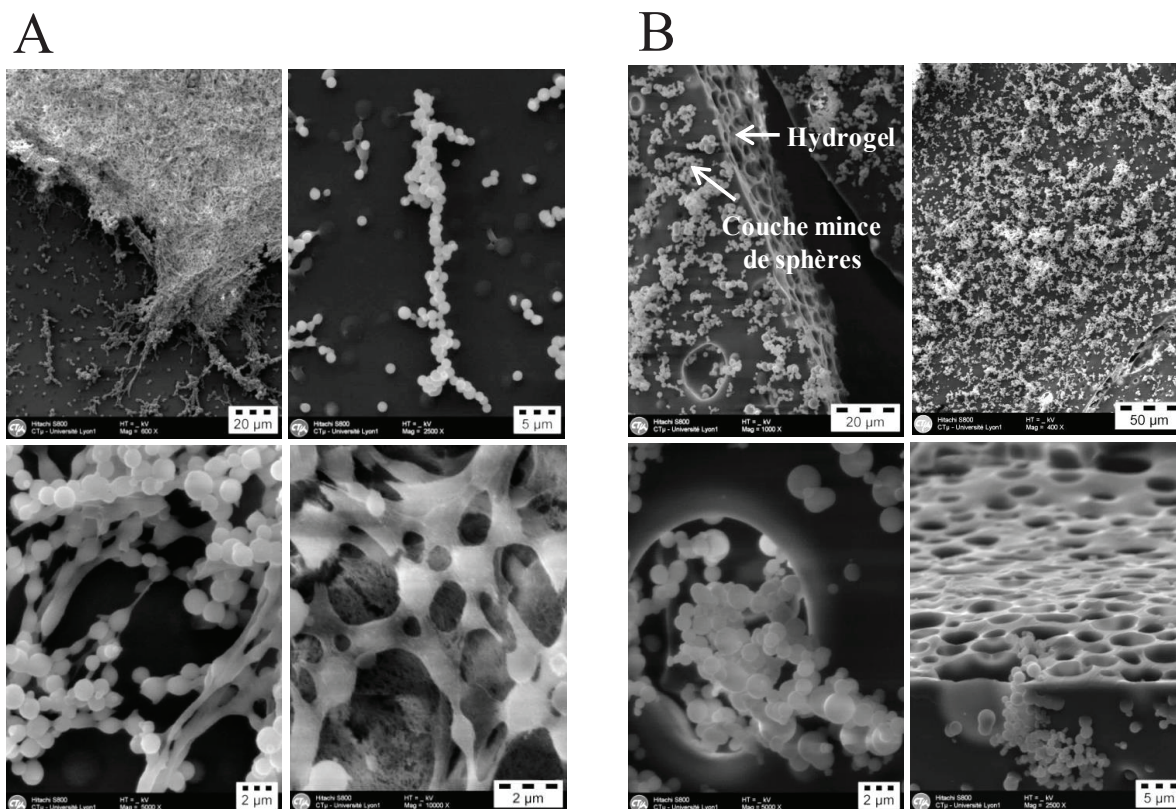


Figure 70: MEB des structures Elactiv' réticulées par de la génipine. A/ MEB des structures d'Elactiv' formées à partir d'une solution de 2 mg/ml d'Elactiv' contenant 50 mM de génipine dans du PBS (n=1). B/ MEB de l'hydrogel Elactiv' formé à partir d'une solution de 50 mg/ml d'Elactiv' contenant 50 mM de génipine dans du PBS (n=1).

III.2. Propriétés mécaniques

Pour étudier les propriétés élastomériques de l'hydrogel Elactiv' réticulé par de la génipine, des tests d'indentation ont été effectués sur l'hydrogel en immersion totale dans le PBS. Les tests d'indentation ont été réalisés pour une charge normale appliquée $F_z = 2 \text{ mN}$ (**Figure 71.A.a**) and $F_z = 4 \text{ mN}$ (**Figure 71.A.b**), pour une vitesse d'indentation constante $V=20 \mu\text{m s}^{-1}$.

Après analyses des courbes d'indentation, le module d'Young réduit, E^* , de l'hydrogel ainsi que le rapport de l'énergie restituée par l'hydrogel au cours de la phase de décharge, peuvent être déterminés. Les résultats indiquent que l'hydrogel Elactiv' présente le même comportement mécanique quelque soit la charge normale appliquée. Le rapport de l'énergie restituée est d'environ 80% (**Figure 71.B**), et le module d'Young réduit de l'hydrogel est compris entre 1,4 MPa et 1,5 MPa (**Figure 71.C**) quelque soit la charge normale appliquée. Ces données soulignent le comportement élastique de l'hydrogel Elactiv'.

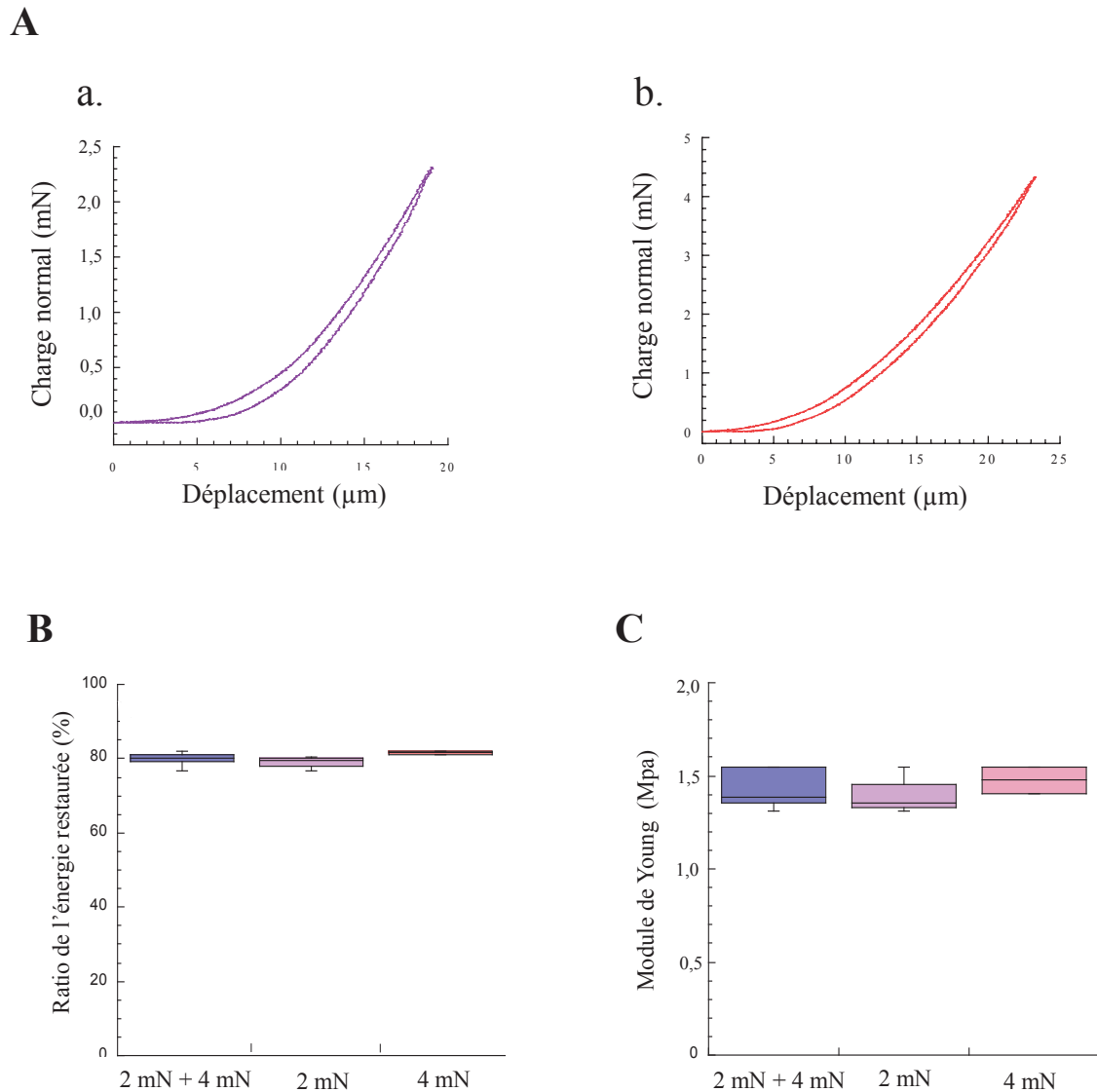


Figure 71: Tests d'indentation réalisés sur l'hydrogel Elactiv' réticulé par la génipine, en immersion totale dans du PBS (n=1). A/ Tests d'indentation sur l'hydrogel Elactiv' réalisés pour une charge normale appliquée $F_z = 2$ mN (a) et $F_z = 4$ mN (b) pour une vitesse d'indentation constante $V = 20 \mu\text{m.s}^{-1}$. B/ Energie restituée par l'hydrogel Elactiv' après avoir subi un test d'indentation avec une charge normale appliquée de 2 et 4 mN. C/ Module d'Young (MPa) de l'hydrogel Elactiv' défini selon la charge normale appliquée sur l'échantillon au cours du test d'indentation.

III.3. Viabilité des fibroblastes dermiques humains cultivés sur l'hydrogel Elactiv'

La biocompatibilité de l'hydrogel Elactiv' avec les fibroblastes dermiques humains (NHDF) a été évaluée par un test de viabilité cellulaire à l'aide du kit Live/Dead qui a permis le marquage fluorescent des cellules viables et mortes. Les cellules viables émettent une forte fluorescence verte tandis que les cellules mortes fluorescent dans le rouge (**Figure 72**). La viabilité des NHDF cultivés sur l'hydrogel Elactiv' a été suivie après 1, 2, 4 et 13 jours de culture. Les résultats révèlent que la grande majorité des fibroblastes ensemencés sur l'hydrogel sont viables 1 jour après l'ensemencement (**Figure 72.A**) et prolifèrent en surface au cours du temps (**Figure 72. B-D**). Ces données nous indiquent une biocompatibilité satisfaisante de l'hydrogel en présence des fibroblastes dermiques. Les cellules ne pénètrent cependant pas à l'intérieur de l'architecture.

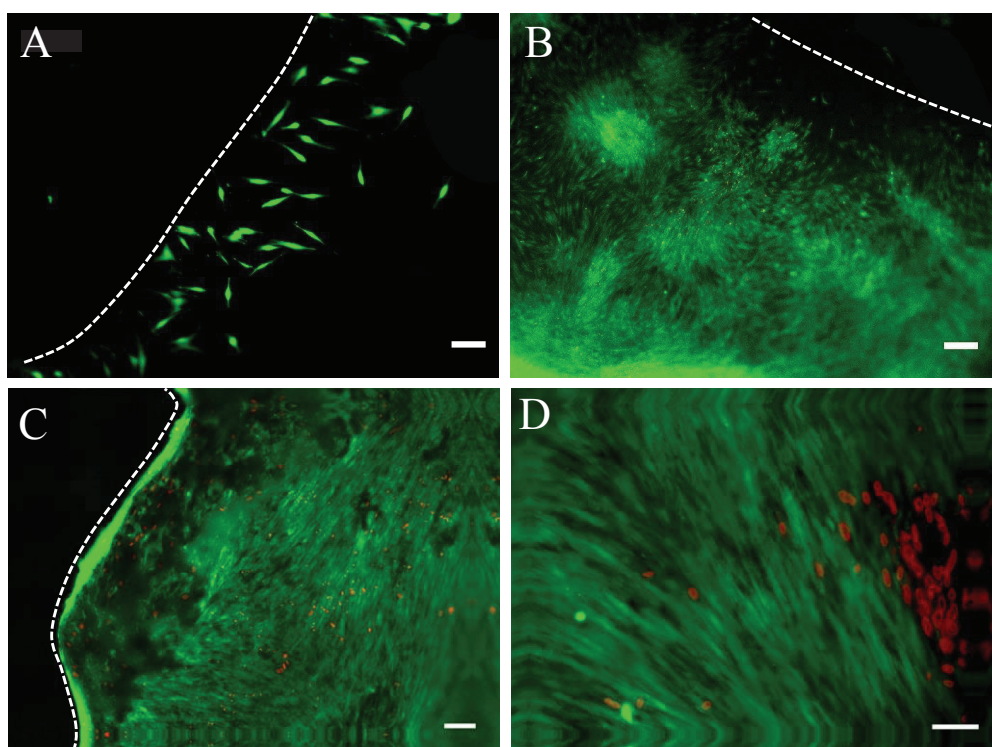


Figure 72: Viabilité des NHDF cultivés sur l'hydrogel Elactiv' réticulé par de la génipine après 1 (A), 2 (B), 4 (C) et 13 jours (D) de culture. Kit Live/Dead pour l'analyse de la viabilité cellulaire avant observation au microscope inversé (Nikon) : les cellules viables apparaissent en vert alors que les cellules mortes sont rouges. Les lignes pointillées blanches délimitent l'hydrogel. Les barres d'échelle indiquent 100 μm (A-C) et 50 μm (D), (n=3).

III.4. Implantation de l'hydrogel Elactiv' en sous-cutanée chez la souris

Après avoir vérifié la biocompatibilité de l'hydrogel Elactiv' *in vitro*, nous avons voulu vérifier sa biocompatibilité et sa résorption *in vivo* en l'implantant pendant 4 semaines en sous-cutanée chez la souris. Des hydrogels de deux épaisseurs différentes ont été implantés : un hydrogel fin (8 μm d'épaisseur) constitué de 10 mg de protéine Elactiv' et un plus épais de 30 mg (1 mm d'épaisseur). Les analyses histologiques, par coloration standard Hématéine-Eosine-Safran, révèlent la présence d'une capsule fibro-inflammatoire formée autour des hydrogels Elactiv' indépendamment de l'épaisseur (Figure 73. A.a et B.a). Cette capsule est constituée de cellules inflammatoires avec en périphérie beaucoup de macrophages (qui fusionnent pour former des « cellules géantes ») et au contact des hydrogels, de nombreux granulocytes sont visibles (Figure 73.B.c). Des débris cellulaires et un peu de nécrose sont également observés dans la capsule. Cette réaction inflammatoire apparaît systématiquement suite à la présence d'un corps étranger dans le tissu cutané. De plus, une néo-vascularisation apparaît en périphérie de la capsule permettant l'extravasation des cellules inflammatoires (Figure 73.A.d). En revanche, l'absence de lymphocytes tend à exclure toute inflammation aiguë. En plus de dégrader la MEC, les cellules inflammatoires, notamment les granulocytes, commencent à dégrader légèrement les bords des hydrogels et à pénétrer à l'intérieur (Figure 73.B.c-d). Cette dégradation est plus marquée lorsque de petits morceaux d'hydrogels se sont décollés (Figure 73. A.c). Par ailleurs, en périphérie de la capsule fibro-inflammatoire, nous pouvons observer une néo-synthèse de MEC qui apparaît en couleur rose-orangé (Figure 73. A.b et B.b). Suite aux résultats obtenus concernant l'hydrogel Elactiv' (module d'élasticité supérieur au module d'élasticité de la peau, 1,5 MPa vs 10 kPa ; réaction inflammatoire suite à une implantation en sous-cutané chez la souris et enfin une très faible dégradation de l'hydrogel par les protéines matricielles), nous avons décidé de combiner la protéine Elactiv' avec un autre polymère dans le but de l'orienter pour présenter sa partie C-terminale, contenant le motif –GRKRRK, aux fibroblastes dermiques. Ainsi, les fonctions biologiques d'Elactiv' seraient conservées. Par conséquent, nous avons utilisé des polymères de structure sphérique constitués uniquement de résidus de lysines et qui se développent de manière arborescente : les dendrigrafts de poly(L-lysine), DGL, synthétisés par l'entreprise COLCOM, partenaire du projet ANR DHERMIC. La structure des DGL est régulière et contrôlée. De plus, ces composés présentent une grande capacité et flexibilité de greffage. Ils sont biocompatibles, immunofurtifs et très soluble dans l'eau. Toutes ces propriétés en font un outil potentiel pour la fonctionnalisation de polymères hydrophobes.

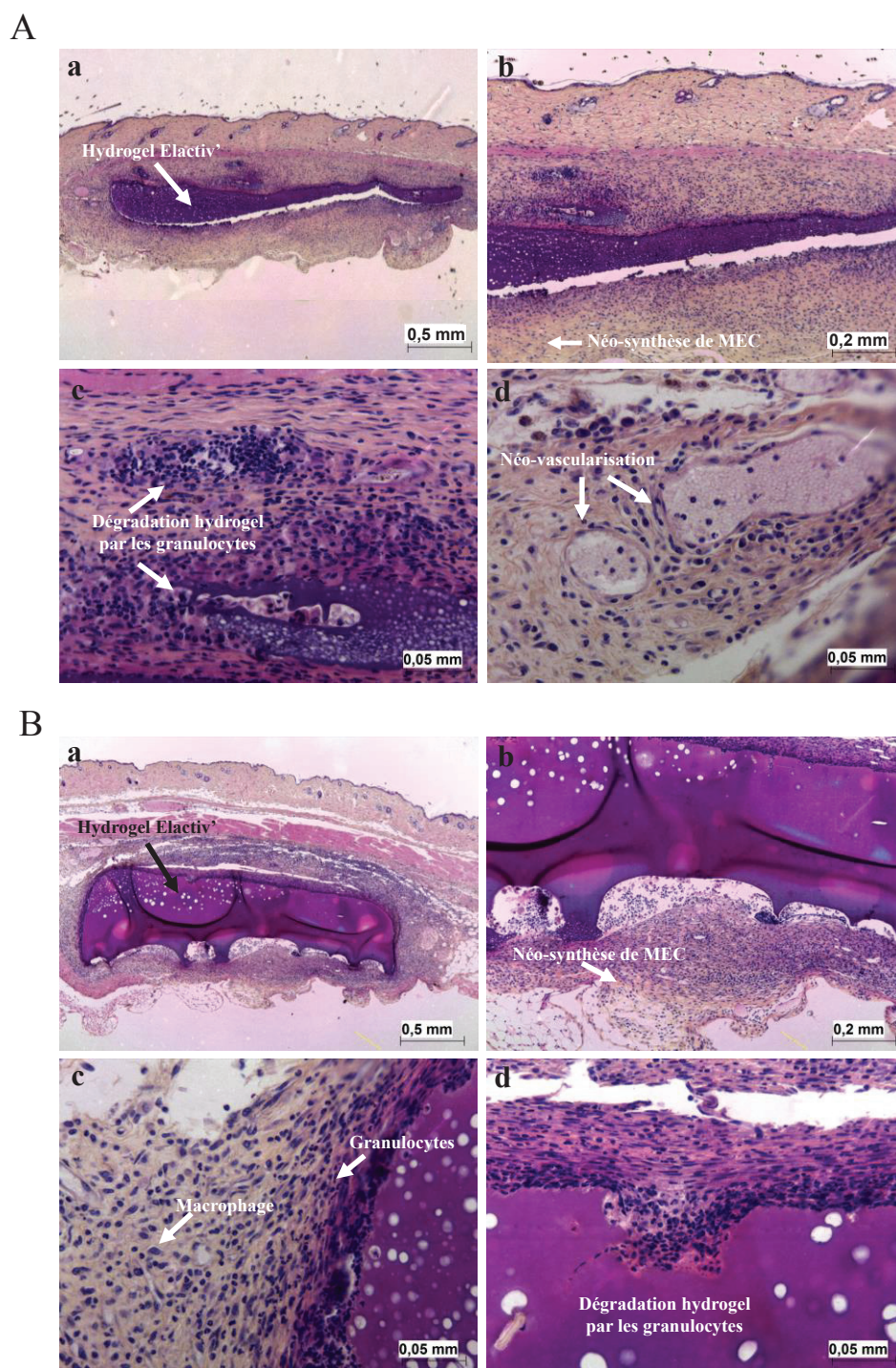


Figure 73: Implantation des hydrogels Elactiv' réticulés par de la génipine en sous-cutanée chez la souris pendant 4 semaines. Coloration hématoxyne-Eosine-Safran du tissu cutané contenant un hydrogel de 10 mg (A) ou 30 mg (B) d'Elactiv' à une concentration finale de 50 mM de génipine (n=1).

IV. Les dendrigrafts de poly(L-lysine) : DGL

La protéine Elactiv' devant être orientée pour présenter son extrémité C-terminale en regard des cellules, un des objectifs de ma thèse a été de la greffer à la surface d'un polymère hautement fonctionnalisable : le DGL. Ce polymère hydrophile n'a jamais été utilisé en tant que support de culture *in vitro*. Il était donc indispensable de vérifier le comportement des fibroblastes dermiques et des kératinocytes humains vis-à-vis de ce substrat.

IV.1. Caractérisation des DGL comme support pour la culture 2D de fibroblastes dermiques humains

IV.1.1 Détermination de la valeur de l'IC50

Toute entité chimique induit une réponse cytotoxique dose-dépendante et spécifique de chaque type cellulaire. Afin d'évaluer la cytotoxicité relative des DGL, des concentrations croissantes (de 1 à 50 µg/ml) de DGL-G2, -G3 et G4 ont été ajoutées dans le milieu de culture de fibroblastes dermiques humains et la viabilité cellulaire a été suivie tous les deux jours en utilisant un indicateur fluorimétrique métabolique, l'UptiBlue (**Figure 74**). La poly(L-lysine) linéaire (PLL) a été utilisée comme référence dans la mesure où ce polymère est couramment utilisé dans les protocoles de culture cellulaire et d'histologie pour favoriser l'adhérence cellulaire. Dans nos conditions, l'IC50 a été déterminée à 18, 25, 30 et 18 µg/ml pour la PLL, les DGL-G2, -G3 et -G4 respectivement. Aux faibles concentrations (1-5 µg/ml), les DGL et la PLL induisent une augmentation de la viabilité cellulaire d'environ 25% comparé aux cellules non traitées. En conclusion, en phase homogène, les DGL et la PLL présentent des profils similaires de cytotoxicité, validant ainsi la gamme de concentrations des DGL, qui est du même ordre de grandeur que la PLL.

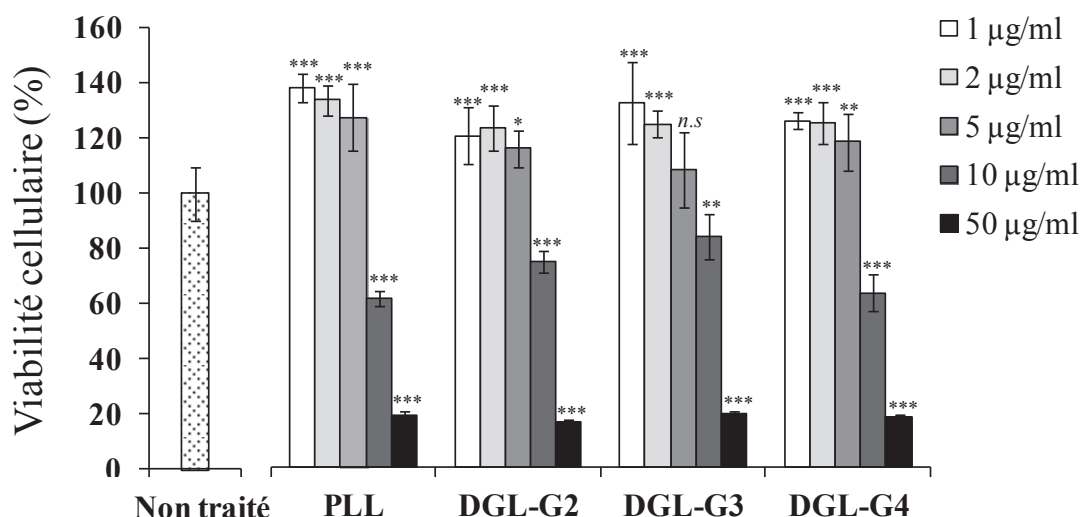


Figure 74: Test de viabilité des fibroblastes dermiques humains en présence des DGL (G2-G4) et de la poly(L-lysine) linéaire (PLL), réalisé en utilisant le réactif UptiBlue. Le contrôle (CTRL) correspond à la condition non traitée. Les cellules sont incubées pendant 2 jours avec du milieu de culture seul ou supplémenté avec de la PLL ou des DGL de génération 2 à 4 suivant une gamme de concentrations variant de 1 à 50 µg/ml. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD de 4 répétitions, et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Une ANOVA à deux facteurs suivie d'un post-test Bonferroni est effectuée pour la détermination des valeurs de p, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; $p < 0,1$ et *n.s* non significatif avec comme référence la condition non traitée.

IV.1.2. Caractérisation des surfaces greffées de DGL

Les polymères synthétiques sont fréquemment utilisés pour fonctionnaliser des supports de culture par adsorption ou greffage covalent, et sur lesquels les cellules adhèrent. Des microplaques de polystyrène ont ainsi été greffées avec des DGL pour évaluer la densité de groupements amines primaires par un test ADECA (*Amino Density Estimation by Colorimetric Assay*) (**Figure 75.A**). Les surfaces greffées de DGL-G2, -G3 et -G4 offrent des densités de groupements amines par nm^2 respectives de $3,66 \pm 0,18$; $4,04 \pm 0,23$ et $7 \pm 0,45$. Le bruit de fond a été déterminé à partir d'un contrôle représenté par une microplaque brute. Des lames de verre fonctionnalisées avec des DGL ont été préparées comme décrit par Coussot *et al* (Coussot, Perrin *et al.* 2011), puis analysées par AFM (*Atomic Force Microscopy*) (**Figure 75.B**). Les valeurs mesurées de la rugosité quadratique moyenne (R_q) pour le contrôle, les DGL-G2, -G3 et -G4 sont respectivement de 0,184 ; 0,457 ; 0,448 et 0,512. Ces résultats révèlent que les topographies de surfaces sont homogènes et différentes des lames de verre brutes.

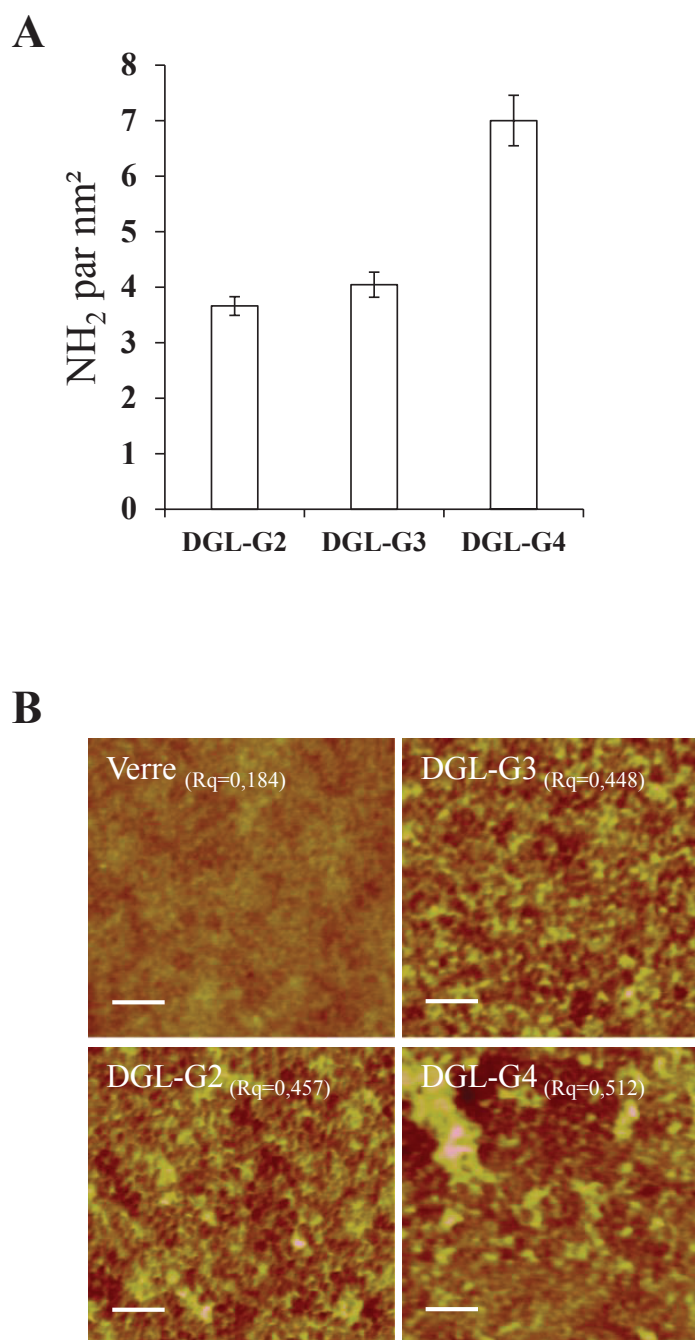


Figure 75: Analyses des surfaces greffées de DGL. A/ Estimation de la densité de groupements aminés des microplaques greffées avec les DGL de génération 2 à 4. Le blanc, correspondant à une microplaque brute, est soustrait. B/ Mesures, par microscopie à force atomique, sur des surfaces de verre brutes ou fonctionnalisées avec des DGL de génération 2 à 4. Rq représente la rugosité quadratique moyenne. La barre d'échelle indique 100 nm.

IV.1.3. Prolifération des fibroblastes

La prolifération des fibroblastes dermiques humains a été déterminée par un test UptiBlue après deux et quatre jours de culture sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL. Une légère augmentation significative de la prolifération est observée dès deux jours après l'ensemencement des cellules sur les polymères cationiques (**Figure 76**). Cette augmentation est confirmée après quatre jours et représente un gain de 33% de l'activité métabolique mesurée comparé au contrôle, qui correspond à la plaque brute.

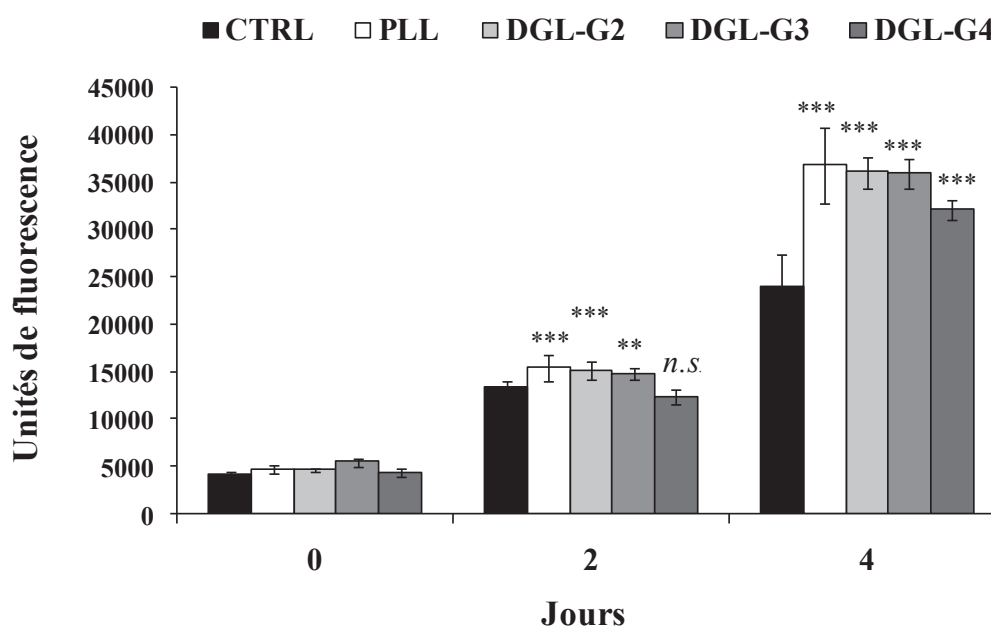


Figure 76: Suivi de la prolifération des fibroblastes dermiques humains sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL (G2-G4) et la PLL, en utilisant le réactif UptiBlue. Le contrôle (CTRL) correspond à la plaque brute. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD, et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test *post hoc* Newman-Keuls est effectuée pour la détermination des valeurs de p, avec comme référence la plaque brute. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; n.s. non significatif.

IV.1.4. Adhérence et étalement des fibroblastes

L'adhérence précoce des fibroblastes dermiques humains sur les DGL a été déterminée par la méthode décrite par Goodwin et Pauli utilisant du Percoll. Cette méthode fournit une semi-quantification sensible apportée par une séparation de phase des cellules non-adhérentes et la mesure du colorant (cristal violet), incorporé dans les cellules adhérentes, par suivi de l'absorbance à 570 nm (Goodwin and Pauli 1995). Les plaques de culture en polystyrène sont généralement traitées avec des méthodes spécifiques dépendantes du commerce dans le but d'améliorer l'adhérence cellulaire. Pour contourner ce paramètre et normaliser les résultats, les plaques ont été bloquées avec de la BSA. L'adhérence a été mesurée 5 min après l'ensemencement des cellules, temps nécessaire à l'adhérence de 50 % des cellules au contact de la PLL dans nos conditions expérimentales. Les résultats révèlent qu'après 5 min, les différentes générations de DGL font preuve de propriétés adhésives plus fortes (15-20%) que la PLL (**Figure 77.A**). Les cellules ayant été trypsiniées avant l'expérience, il s'agit ici d'une adhérence précoce passive ne faisant pas intervenir de système d'ancrage via les protéines membranaires..

Les cellules ont ensuite été observées à un stade plus avancé de l'adhérence cellulaire par microscopie confocale (**Figure 77.B**). Après 30 min, les cellules présentent des extensions cytoplasmiques circulaires avec des structures de filaments d'actine sur des surfaces de PLL et DGL, tandis que les cellules sur le contrôle ont une forme ronde avec un réseau d'actine diffus. L'aire recouverte par les cellules a encore grandi après 60 min d'incubation. En revanche, aucune différence notable n'est observée entre les conditions PLL et DGL alors que l'étalement des cellules sur les plaques contrôles est toujours retardé. Une fois que les cellules approchent de leur aire maximale, leur membrane plasmique présente des contours moins réguliers.

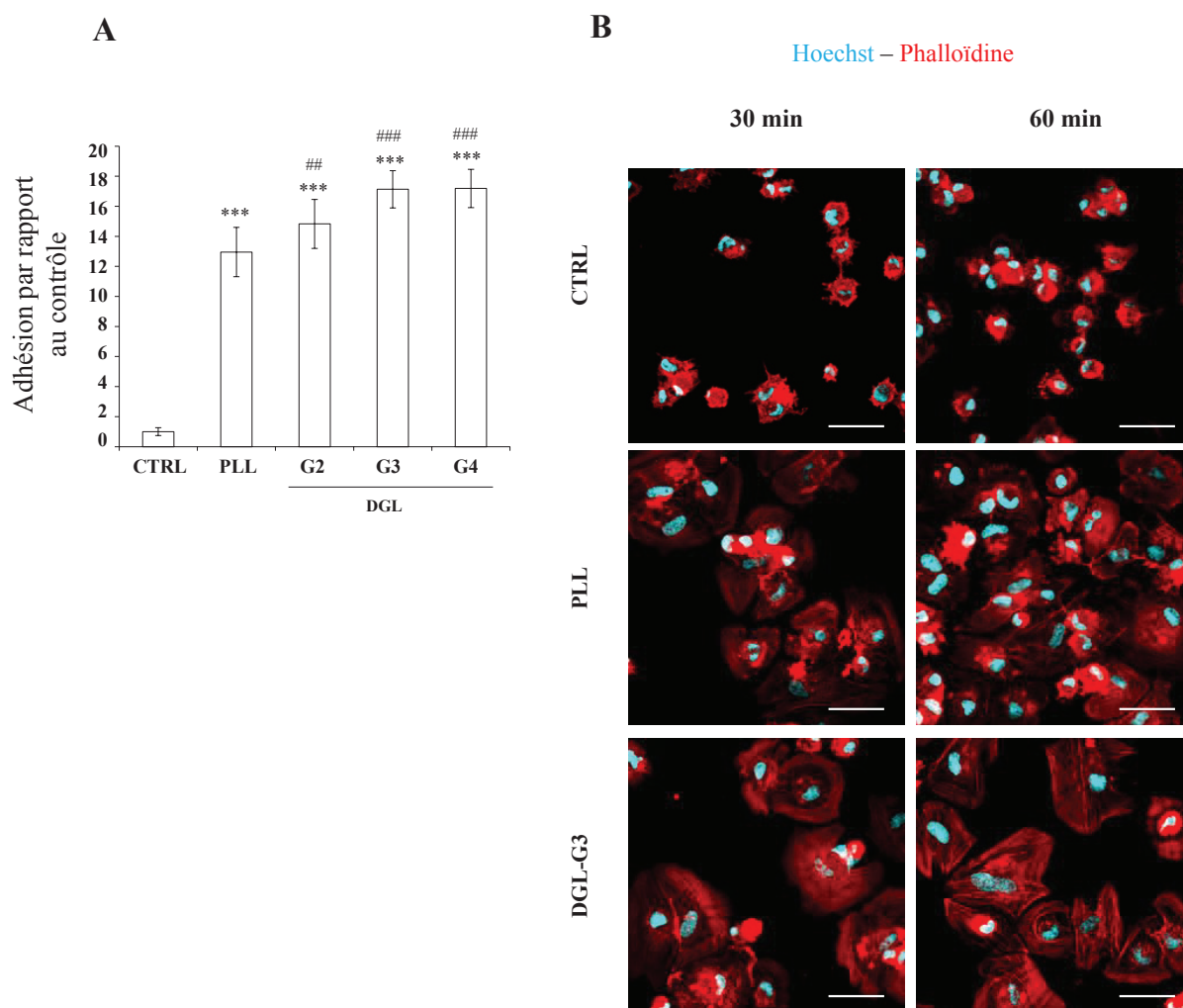


Figure 77: Adhérence précoce et étalement des fibroblastes dermiques humains sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL (G2-G4) et la PLL. A/ Test d'adhérence cellulaire réalisé sur les DGL (G2-G4) et la PLL, en utilisant la méthode du Percoll et la plaque brute en contrôle. Les cellules sontensemencées pendant 5 minutes. Après fixation et coloration au Cristal Violet, le colorant incorporé est dissous et l'absorbance est mesurée à 570 nm. Les données sont exprimées en moyenne \pm SD ($n=8$), et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés par rapport au contrôle. Une ANOVA à un facteur suivie d'un test *post hoc* Newman-Keuls est effectuée pour la détermination des valeurs de p . *** $p<0,001$ par rapport au contrôle, ### $p<0,001$ et ## $p<0,01$ par rapport à la condition PLL. B/ Etalement des cellules observé par microscopie confocale ($n=3$). Les cellules sontensemencées sur des surfaces en verre fonctionnalisées avec la PLL et les DGL-G3, puis fixées aux temps indiqués. Le contrôle (CTRL) correspond au verre brut. Les noyaux cellulaires et les réseaux d'actine sont contremarqués en utilisant respectivement le colorant Hoechst (cyan) et la phalloïdine conjuguée à la rhodamine (rouge). Les barres d'échelle indiquent 50 μm .

En plus de l'étalement, les processus de migration et d'adhérence cellulaires sont contrôlés par des mécanismes actifs, qui nécessitent *in vitro* un fort attachement à la surface. Les macromolécules matricielles se lient principalement aux cellules par l'intermédiaire des intégrines, protéines hétérodimériques localisées à la surface cellulaire. Le récepteur de la fibronectine, l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, est fortement exprimé dans les fibroblastes et favorisent leur adhérence et leur motilité au cours du remodelage de la MEC et de la cicatrisation des plaies, grâce à la séquence consensus Arg-Gly-Asp (RGD) contenue dans la fibronectine (Takagi 2004; Kato, Okamoto *et al.* 2011). Il a été démontré que des monocouches auto-assemblées, avec une haute densité de groupements NH_2 , présentent une forte affinité pour l'intégrine $\alpha_5\beta_1$; à l'inverse, la PLL est bien connue pour être un polymère indépendant de l'intégrine (Fauchaux, Tzoneva *et al.* 2006). Pour savoir si les DGL sont capables de se lier à ce récepteur, les fibroblastes dermiques humains ont été cultivés pendant deux jours sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL-G2, -G3 et -G4 et la PLL, avec en contrôle la plaque brute. L'expression des sous-unités composant l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ a été analysée par western blot (**Figure 78.A**). La sous-unité α_5 est deux fois plus exprimée dans les cellules cultivées sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL tandis qu'une expression basale identique est observée dans les cellules cultivées sur le contrôle et la PLL. En revanche, aucune variation de l'expression de la sous-unité β_1 n'est observée dans ces conditions. Des études précédentes ont rapporté que certains supports synthétiques entraînaient une activation de l'intégrine $\alpha_5\beta_3$ dans les cellules endothéliales et, dans une moindre mesure, dans les fibroblastes (Hung, Chu *et al.* 2012). De plus, en réponse à cette activation, une augmentation de la MMP-2 a été observée.

Par conséquent, nous avons cherché à savoir si les niveaux d'expression et d'activité des gélatinases, MMP-2 et -9, étaient modifiés après deux jours de culture des fibroblastes dermiques sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL. Pour cela, nous avons utilisé la technique de zymographie à partir des milieux conditionnés de fibroblastes. Les résultats ne montrent aucune différence ni dans la sécrétion de la proMMP-2, ni dans son activation (**Figure 78.B**). D'autre part, aucune forme de la MMP-9 n'a pu être observée dans les conditions testées.

En conclusion, les DGL favorisent l'adhérence précoce et l'adhérence active, par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, des fibroblastes dermiques humains par rapport à la PLL. En revanche, les DGL n'influe pas sur les niveaux d'activité et d'expression de la MMP-2.

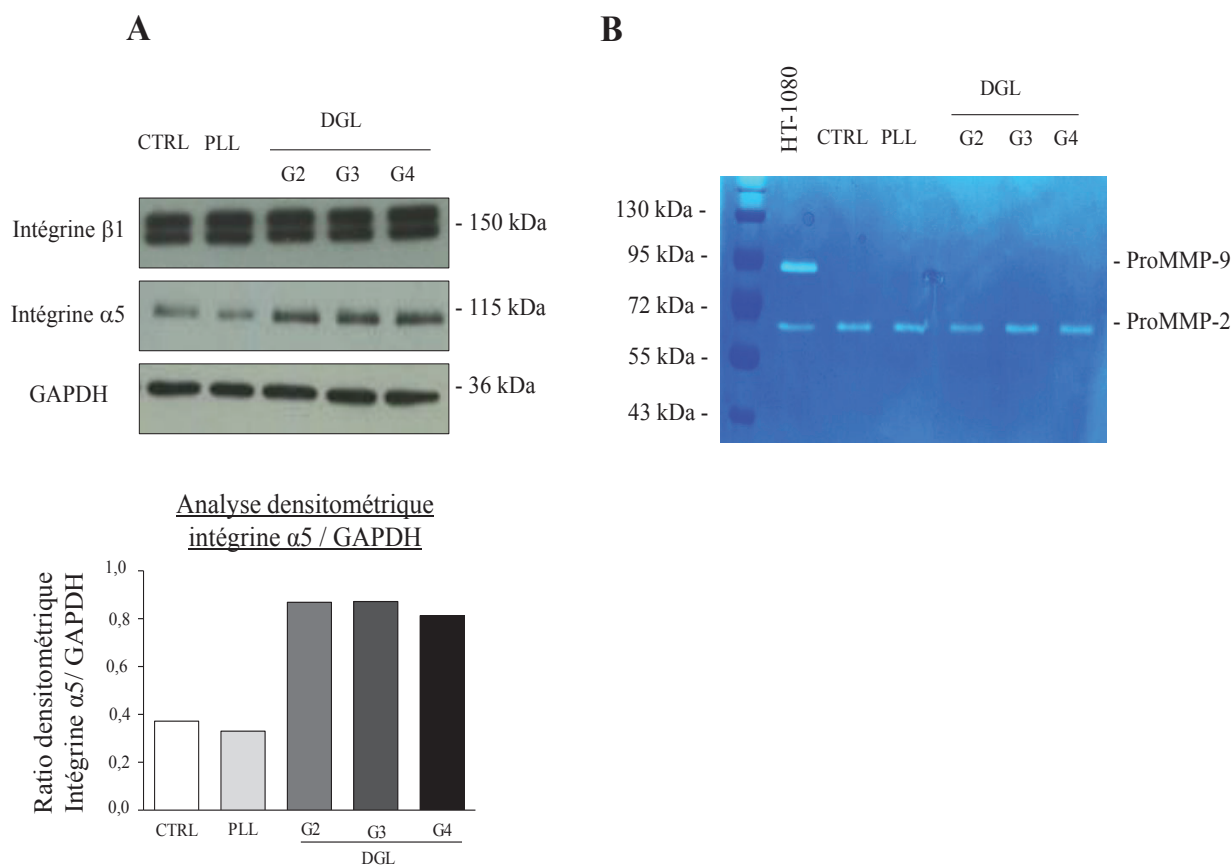


Figure 78: Système d'adhérence actif des fibroblastes dermiques humains sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL (G2-G4) et la PLL. A/ Analyse par western blot de l'expression des intégrines $\beta 1$ et $\alpha 5$. Les cellules sont cultivées pendant 48h sur les DGL de génération 2 à 4 et la PLL, avant l'extraction totale des protéines et l'analyse par western blot des expressions des intégrines $\beta 1$ et $\alpha 5$. Le contrôle (CTRL) correspond à la plaque brute. La GAPDH est utilisée en contrôle interne pour s'assurer de l'uniformité du chargement des échantillons. Les résultats obtenus pour l'intégrine $\alpha 5$ sont normalisés avec la GAPDH, puis quantifiés par analyse densitométrique à l'aide du logiciel Image J. B/ Analyse des milieux conditionnés des fibroblastes dermiques humains, préalablement cultivés sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL (G2-G4) et la PLL, pour évaluer par zymographie les activités gélatinolytiques des MMP-2 et MMP-9 (n=1). Le contrôle (CTRL) correspond à la plaque brute. Le milieu conditionné de la lignée de fibrosarcomes humains HT1080 est utilisé comme référence.

IV.2. Caractérisation des DGL comme support pour la culture 2D de kératinocytes humains

A partir de cette étude, nous nous sommes focalisé sur la génération 3 des DGL, qui offre un bon compromis entre une structure sphérique de diamètre acceptable, pour éviter l'auto-agrégation des molécules de DGL, et une densité de fonction NH_2 satisfaisante pour la conservation des propriétés physico-chimiques et biologiques des polymères. Tout comme nous l'avons fait pour la protéine Elactiv', nous avons voulu évaluer le potentiel progéniteur des kératinocytes primaires humains (NHK) cultivés sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL-G3. Pour cela, nous avons évalué la capacité des cellules à se diviser et à former des colonies, en présence des DGL-G3, après trois générations de douze jours de culture. Le contrôle correspond à la plaque brute. Les résultats révèlent qu'après deux générations, les kératinocytes, cultivés sur les DGL-G3, ne sont plus capables de se diviser et de former de nouvelles colonies pour la 3^{ème} génération, comparativement au contrôle (**Figure 79.A**). Le potentiel progéniteur des kératinocytes est donc diminué en présence des DGL-G3. La quantification du nombre et de la taille des colonies, selon la méthode de Stachelscheid (Stachelscheid, Ibrahim *et al.* 2008) confirme cette perte de potentiel dès la première génération (**Figure 79.B**). En effet, les cellules cultivées sur les DGL-G3 présentent 62 ± 4 de grandes colonies, 8 ± 6 de colonies moyennes et 2 ± 1 de petites colonies, comparé au contrôle qui affiche 51 ± 3 , 18 ± 3 et 12 ± 2 pour les grandes, moyennes et petites colonies respectivement. Il est vrai que le pourcentage de grandes colonies est plus élevé pour les DGL-G3, comparé au contrôle. Néanmoins, cette tendance est inversée pour la 2^{ème} génération où le nombre de grandes colonies est de 22 ± 3 pour les DGL-G3 comparé au contrôle où il est de 57 ± 5 . L'absence de colonies sur les DGL-G3 pour la 3^{ème} génération signifie que les kératinocytes de 2^{ème} génération n'ont pas été capables de se diviser et de former de nouvelles colonies : ils ont perdu leur potentiel progéniteur contrairement au contrôle où l'on dénombre encore 30 ± 17 de grandes colonies et 2 ± 1 de colonies moyennes. En conclusion, la clonogénicité des kératinocytes est diminuée au contact des DGL-G3. Cela pourrait s'expliquer par une adhérence plus importante ou une entrée en différenciation plus précoce.

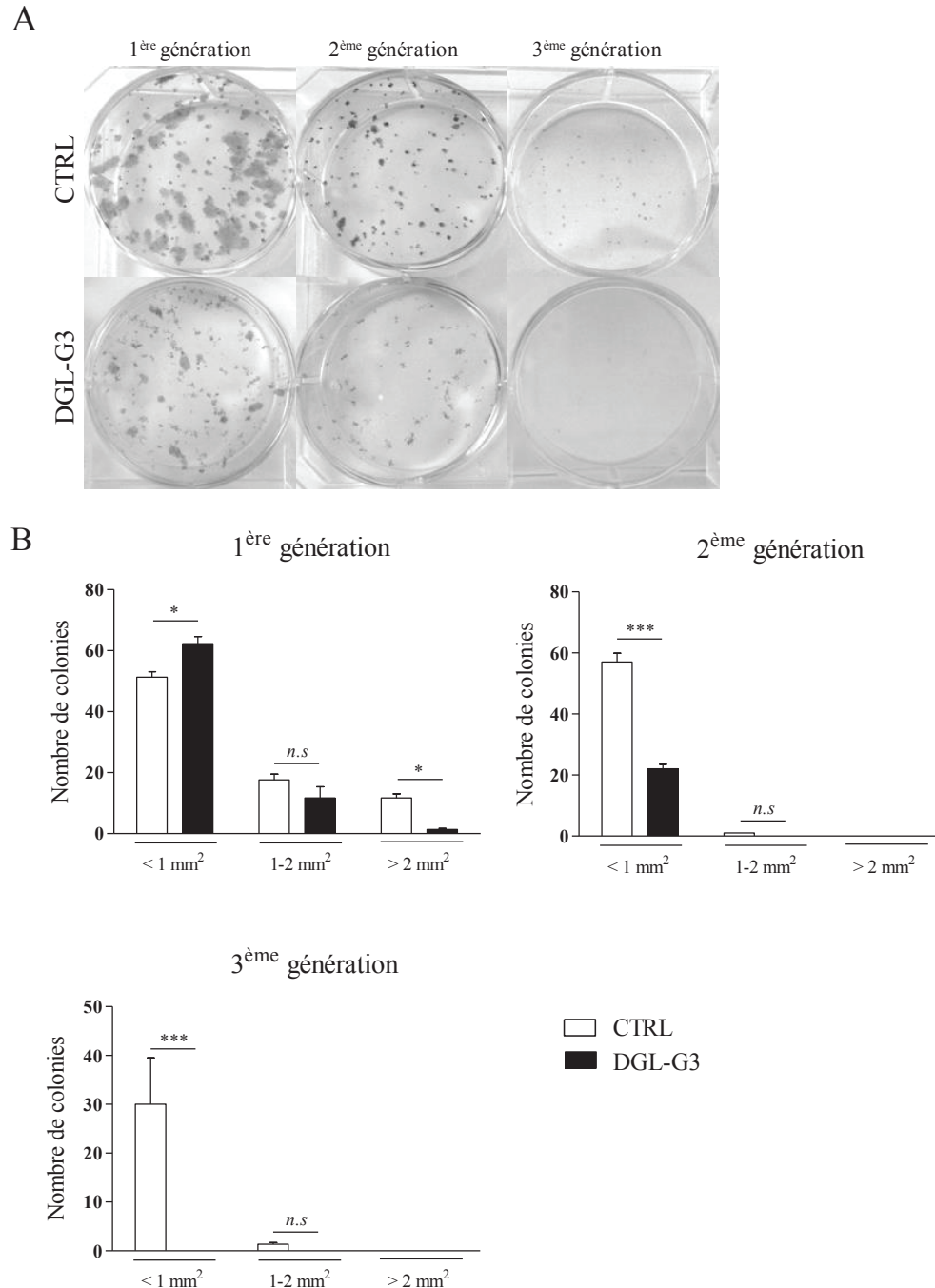


Figure 79: Effet des DGL-G3 sur le potentiel progéniteur des Kératinocytes primaires

humains. A/ Etude de la capacité des kératinocytes à se diviser et à former des colonies « Colony Forming Efficiency » sur des surfaces fonctionnalisées avec 20 µg/ml de DGL-G3. Le contrôle (CTRL) correspond à la plaque brute. B/ Quantification du nombre et de la taille des colonies visualisées en (A) selon la méthode de Stachelscheid (Stachelscheid, Ibrahim et al. 2008) qui classe les colonies en trois catégories : petites (<1mm²), moyennes (1-2 mm²) et grandes colonies (>2mm²). Les données représentent la moyenne ± SEM (n=3). Une ANOVA à deux facteurs suivie d'un post test Bonferroni est effectuée pour la détermination des valeurs de p. *** $p < 0,001$; * $p < 0,1$; n.s non significatif.

V. Etude de l'assemblage de l'unité hybride

Dans le but de valider l'assemblage de l'unité hybride (Dendrigraft de poly(L-lysine) (DGL) + Elactiv'), un test ADECA a été réalisé. Le greffage covalent d'Elactiv' à la surface des DGL-G3 requiert un bras espaceur, le NHS-C4-maléimide, qui de part son groupement maléimide, réagit préférentiellement avec la fonction thiol (-SH) présente au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine élastique, pour former une liaison thioéther (**Figure 80**). Cette réaction est rendue possible en milieu tamponné (pH 6,5-7,5).

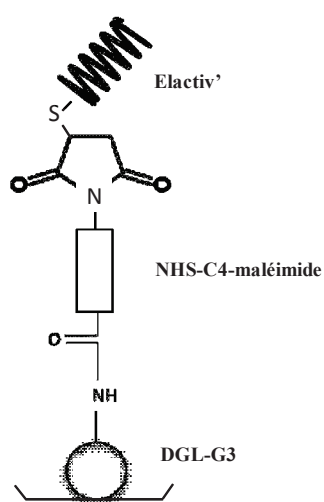


Figure 80: Schéma représentant l'assemblage de l'unité hybride (DGL-G3 + NHS-C4-maléimide + Elactiv').

Les résultats du test ADECA montrent une diminution du pourcentage résiduel d'amines suite au greffage du NHS-C4-maléimide à la surface des DGL-G3. Ce résultat démontre que le bras espaceur s'est bien couplé aux amines à la surface des DGL, qui ne sont alors plus disponibles pour le colorant. Une légère ré-augmentation de ce pourcentage fait suite au greffage d'Elactiv' sur le groupement maléimide du bras espaceur (**Tableau 5**). Ce résultat est en faveur du greffage d'Elactiv' puisque la protéine élastique possède des lysines au sein de sa séquence qui deviennent alors disponibles pour le colorant. Par conséquent, Elactiv' semble se greffer sur le NHS-C4-maléimide, lui-même greffé à la surface des DGL-G3.

Pourcentage résiduel d'amines: moyenne de 4 réplicats (écart-type)	Concentration Elactiv'					
Concentration bras espaceur NHS-C4-Maléimide	0 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
0 mg/ml	100 (4,491)	104,0 (5,443)	103,9 (2,408)	100,4 (2,952)	98,5 (4,024)	98,6 (4,617)
0,028 mg/ml	82,4 (16,081)	94,9 (2,287)	97,5 (2,156)	92,1 (1,698)	94,7 (3,033)	93,7 (2,432)
0,28 mg/ml	72,4 (2,971)	77,1 (1,295)	81,2 (1,485)	79,7 (4,042)	83,5 (1,873)	86,5 (1,826)
2,8 mg/ml	58,4 (3,326) *** p<0,001	62,1 (0,231)	68,0 (2,569)	70,4 (6,573)	67,7 (3,315)	82,3 (5,013) ### p<0,001

Tableau 5: Validation de l'assemblage de l'unité hybride (DGL + NHS-C4-Maléimide + Elactiv') par un test ADECA « Amino Density Estimation by Colorimetric Assay » avec comme tampon de greffage le PBS (n=4). Les DGL-G3 sont adsorbés sur une microplaque de polystyrène à une concentration finale de 10 µg/ml, dans du PBS 2h à 4°C. Après 3 rinçages de la microplaque au PBS, le NHS-C4-maléimide est greffé sur les DGL-G3 suivant une gamme de concentration variant de 0 à 2,8 mg/ml, dans du PBS pendant 2h à température ambiante. Après 3 rinçages, Elactiv' est greffée sur le groupement maléimide du bras espaceur suivant une gamme de concentration variant de 0 à 100 µg/ml, dans du PBS pendant 2h à température ambiante. Après 3 rinçages à l'eau, la microplaque est colorée avec une solution de Coomassie Brilliant Blue (CBB) pendant 2 min à température ambiante. L'excès de colorant est éliminé avant l'étape de détection (tampon de détection et HCl (3N)) et l'absorbance est mesurée à 611 nm. Les résultats sont représentés en pourcentage résiduel d'amines pour chaque condition, et représentent la moyenne ± SD de 4 réplicats. Une ANOVA à deux facteurs suivie d'un post test Bonferroni a permis de déterminer les valeurs de p, *** p<0,001 avec comme référence la condition « 0 µg/ml Elactiv'- 0 mg/ml NHS-C4-maléimide » et ### p<0,001 avec comme référence la condition « 0 µg/ml Elactiv'- 2,8 mg/ml NHS-C4-maléimide ».

Suite à ces résultats, nous avons validé l'assemblage de l'unité hybride et nous avons voulu observer l'étalement des fibroblastes dermiques humains (NHDF) après 30 et 60 min d'adhérence sur l'unité hybride, comparé aux DGL-G3 et à Elactiv' (**Figure 81**). Après 60 min d'adhérence, les cellules présentent des extensions cytoplasmiques circulaires avec des structures de filaments d'actine sur des surfaces fonctionnalisées avec l'unité hybride et les DGL-G3 (**Figure 81.D et F-H**). En revanche, les cellules ont un aspect étoilé sur des surfaces fonctionnalisées avec la fibronectine et Elactiv' (**Figure 81.C et E**). Par conséquent, les fibroblastes ayant adhéré sur l'unité hybride présentent une morphologie identique à ceux ayant adhéré sur les DGL-G3, signifiant qu'Elactiv' ne se serait pas greffée à la surface des DGL-G3 (par l'intermédiaire du bras espaceur). Une autre hypothèse envisagée est que les forces passives électrostatiques induites par les DGL seraient très importantes, au point que le mécanisme actif d'adhérence, potentiellement apporté par la présence d'Elactiv', deviendrait négligeable devant ce phénomène. D'autre part, étant donné le caractère hautement cationique des DGL-G3, des forces de répulsions sont susceptibles de se créer entre ces polymères et la protéine Elactiv'.

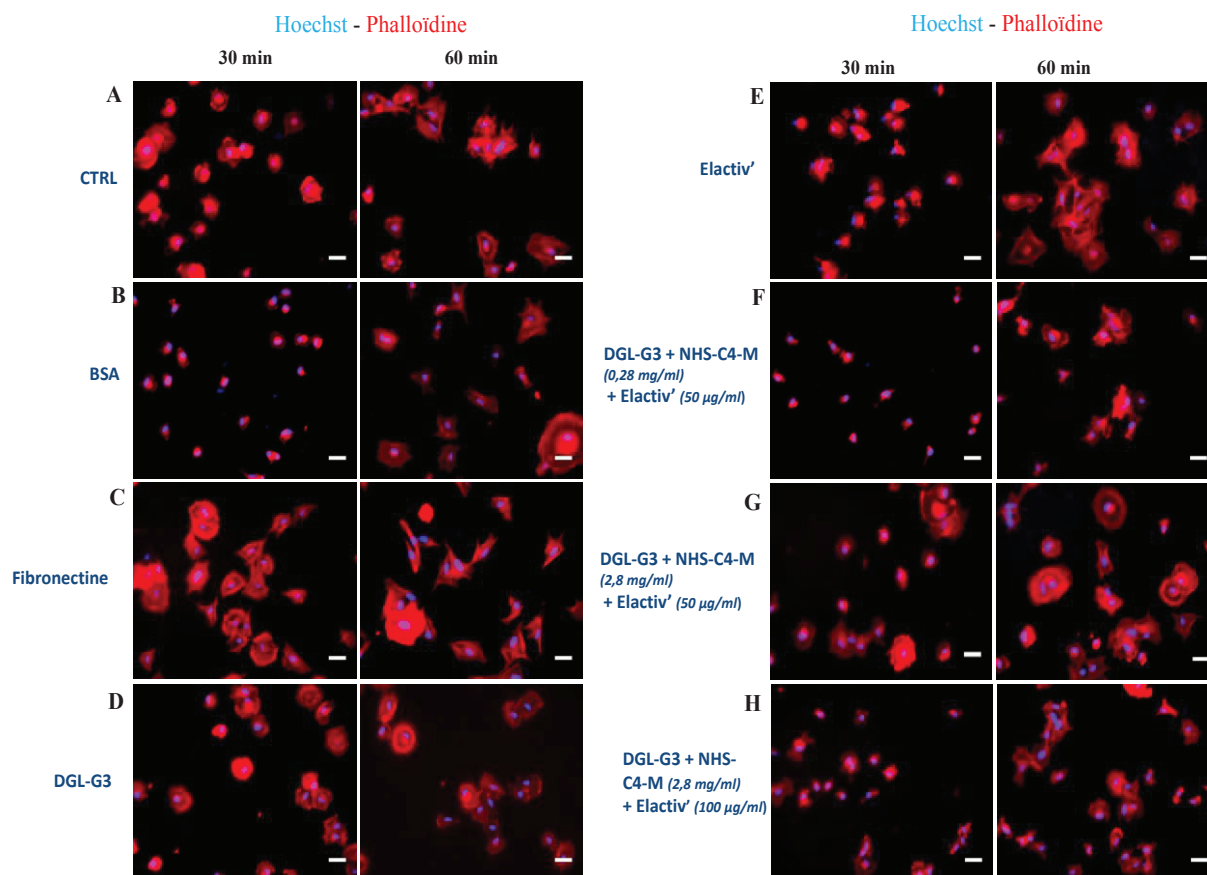


Figure 81: Etalement des fibroblastes dermiques humains sur l'unité hybride (DGL-G3 + NHS-C4-maléimide + Elactiv') observé par microscopie à épifluorescence (n=1). De la BSA (B), de la fibronectine C), des DGL-G3 (D), Elactiv' (E) et des DGL-G3 en combinaison avec le NHS-C4-maléimide et Elactiv' (F-H) sont adsorbés sur des lames en verre à une concentration finale de 10 µg/ml, dans du PBS pendant 2h à 4°C. Le contrôle correspond au verre brut (A). Après 3 rinçages des puits au PBS, le NHS-C4-maléimide est greffé sur les DGL-G3 à une concentration finale de 0,28 mg/ml (F) ou de 2,8 mg/ml (G et H), dans du PBS pendant 2h à température ambiante. Après 3 rinçages, Elactiv' est à son tour greffée à une concentration finale de 50 µg/ml (F et G) ou 100 µg/ml (H), dans du PBS pendant 2h à 4°C. Après rinçage des puits, les cellules sontensemencées à une densité de $1,5 \cdot 10^5$ cellules.cm⁻², et fixées aux temps indiqués. Les noyaux cellulaires et les réseaux d'actine sont contremarqués en utilisant respectivement le colorant Hoechst (cyan) et la phalloïdine conjuguée à la rhodamine (rouge). Les barres d'échelle indiquent 20 µm.

Ainsi, pour diminuer les forces de répulsion entre ces deux entités, les DGL-G3 ont été greffés covalamment à la surface des microplaques de polystyrène dans le but d'obtenir une monocouche homogène de polymères et ainsi contrôler la quantité des DGL greffés. Un test ADECA a été réalisé pour valider l'assemblage de l'unité hybride. Suite au greffage du NHS-C4-maléimide à la surface des DGL-G3, une diminution du pourcentage résiduel d'amines est observée, signalant le greffage du bras espaceur (**Tableau 6**). En revanche, le greffage d'Elactiv' sur le NHS-C4-maléimide ne conduit pas à une ré-augmentation de ce pourcentage. Elactiv' ne semble donc pas se greffer sur le groupement maléimide du bras espaceur. Par conséquent, le greffage covalent des DGL-G3 ne permettrait pas de diminuer les forces de répulsion entre les polymères et Elactiv' si tant est que ce soit ce phénomène qui soit à la base du problème rencontré.

Pourcentage résiduel d'amines	Concentration Elactiv'		
Concentration NHS-C4-Maléimide	0 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
0 mg/ml	100	82,8	72,0
0,28 mg/ml	49,7	41,8	38,5
2,8 mg/ml	36,1	31,2	35,2

Tableau 6: Validation de l'assemblage de l'unité hybride (DGL + NHS-C4-Maléimide + Elactiv') avec greffage covalent des DGL-G3, par un test ADECA (n=1). Les DGL-G3 sont greffés sur une microplaque Costar DNA bind à une concentration de 10 mg/ml pendant 12h à température ambiante dans du tampon bicarbonate (0,1M, pH 9,6). Les DGL qui n'ont pas réagi sont éliminés en lavant la microplaque avec du tampon bicarbonate, qui est ensuite plongée dans un bain à ultrasons, contenant un mélange de tampon carbonate-bicarbonate 0,25 M pH 11,25 avec du méthanol (v/v, 1:1), 2h à température ambiante. Après rinçage de la microplaque dans l'acide acétique et dans l'eau, le NHS-C4-maléimide et Elactiv' sont greffés suivant le même protocole décrit dans le tableau 5, avec entre chaque greffage, un lavage dans le bain à ultrasons. Pour le test ADECA, la microplaque est colorée avec une solution de Coomassie Brilliant Blue (CBB) pendant 2 min à température ambiante. L'excès de colorant est éliminé avant l'étape de détection (tampon de détection et HCl (3N)) et l'absorbance est mesurée à 611 nm. Les résultats sont représentés en pourcentage résiduel d'amines pour chaque condition.

Toujours pour tenter de diminuer les forces de répulsions entre les DGL-G3 et Elactiv', nous avons décidé d'utiliser des tampons salins (PBS NaCl 0,4-0,5M ; Hépès, Tris-HCl pH7) au cours de l'assemblage de l'unité hybride. Les résultats du test ADECA montrent une diminution du pourcentage résiduel d'amines suite au greffage du NHS-C4-maléimide à la surface des DGL-G3, et toujours une légère augmentation de ce pourcentage suite au greffage d'Elactiv' sur le groupement maléimide du bras espaceur, avec tout de même une amélioration avec les tampons hépès et Tris-HCl pH 7 (**Tableau 7**).

Pourcentage résiduel d'amines	Concentration Elactiv'								
Concentration NHS-C4-Maléimide	0 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	0 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	0 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
0 mg/ml	100,0	102,6	104,8	100,0	125,9	124,0	100,0	122,8	127,5
0,28 mg/ml	58,0	78,5	78,1	75,9	88,9	92,7	81,6	103,0	107,1
2,8 mg/ml	38,8	55,8	61,9	46,0	57,3	61,4	57,2	72,6	85,0
0 mg/ml	100,0	114,1	115,6	100,0	120,7	130,9			
0,28 mg/ml	59,1	84,8	90,7	62,4	89,4	97,8			
2,8 mg/ml	48,4	71,4	82,5	49,1	79,1	99,1			

PBS
 PBS, NaCl 0,4 M
 PBS, NaCl 0,5 M
 Hépès
 Tris-HCl pH 7

Tableau 7: Validation de l'assemblage de l'unité hybride (DGL + NHS-C4-Maléimide + Elactiv'), par un test ADECA, avec comme tampons de greffage des tampons salins (n=1). Les DGL-G3 sont adsorbés sur une microplaque de polystyrène à une concentration finale de 10 µg/ml, dans du PBS, PBS NaCl 0,4 M, PBS NaCl 0,5 M, Hépès et Tris-HCl pH 7, pendant 2h à 4°C. Après 3 rinçages de la microplaque dans les tampons respectifs, le NHS-C4-maléimide est greffé sur les DGL-G3 suivant une gamme de concentration variant de 0 à 2,8 mg/ml, dans les différents tampons salins pendant 2h à température ambiante. Après 3 rinçages, Elactiv' est greffée sur le groupement maléimide du bras espaceur suivant une gamme de concentration variant de 0 à 100 µg/ml, dans les tampons salins pendant 2h à température ambiante. Après 3 rinçages à l'eau, la microplaque est colorée avec une solution de Coomassie Brilliant Blue (CBB) pendant 2 min à température ambiante. L'excès de colorant est éliminé avant l'étape de détection (tampon de détection et HCl (3N)) et l'absorbance est mesurée à 611 nm. Les résultats sont représentés en pourcentage résiduel d'amines pour chaque condition.

Suite à ces observations, nous avons voulu vérifier que la présence de la protéine Elactiv' était bien due à un greffage covalent sur le bras espaceur de par sa fonction thiol (-SH) libre présente à son extrémité N-terminale, et non à une adsorption sur l'ensemble DGL-G3/bras espaceur. Pour cela, la validation du greffage par immuno-marquage a été réalisée, permettant de visualiser la reconnaissance d'Elactiv' par un anticorps anti-FLAG (spécifique de l'extrémité N-terminale d'Elactiv'), en dosant par une réaction colorée cet anticorps spécifique. La valeur de l'absorbance obtenue pour la condition « DGL-G3 + NHS-C4-maléimide + Elactiv' » est significativement plus importante comparée aux conditions « Elactiv' seule » et « DGL-G3 + Elactiv' » (**Figure 82**). En revanche, les valeurs d'absorbances obtenues pour « Elactiv' seule » et « DGL-G3 + Elactiv' » sont quasi identiques signifiant qu'Elactiv' s'adsorbe quoi qu'il en soit à la surface des DGL-G3, même en absence du bras espaceur. Par conséquent, il est impossible à ce stade de savoir si Elactiv' se greffe bien sur le groupement maléimide du bras espaceur.

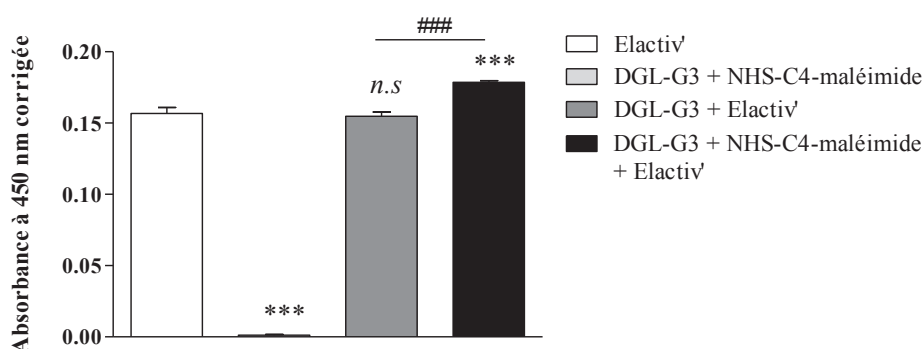


Figure 82: Validation du greffage de la protéine Elactiv' sur le groupement maléimide du NHS-C4 maléimide par immunomarquage. Les DGL-G3 et Elactiv' sont adsorbés sur une microplaque aux concentrations respectives de 10 µg/ml et 50 µg/ml dans du PBS, 2h à 4°C. Le NHS-C4-maléimide est, quant à lui, greffé à 0,28 mg/ml dans du PBS, 30 min à température ambiante. Le greffage d'Elactiv' sur le groupement maléimide est évalué par une technique immuno-enzymatique de détection permettant de visualiser la réaction Elactiv'- anticorps anti-FLAG (spécifique de l'extrémité N-terminale d'Elactiv'), en dosant par une réaction colorée cet anticorps spécifique. Les valeurs des absorbances obtenues sont corrigées du « blanc » (correspondant au plastique brut). Les données représentent la moyenne ± SEM (n=8). Une ANOVA à un facteur suivie d'un test *post hoc* Newman-Keuls est effectuée pour la détermination des valeurs de p. *** $p < 0,001$; n.s. non significatif par rapport à la condition Elactiv', et ### $p < 0,001$ par rapport à la condition DGL-G3 + Elactiv'.

Pour tenter de résoudre ce problème et suivre la réaction entre le thiol libre d'Elactiv' et le groupement maléimide du bras espaceur, nous avons décidé d'utiliser un groupement maléimide couplé à un fluorophore, le N-(5-fluorescéinyl) maléimide. De plus, pour optimiser cette réaction et rendre accessible la fonction thiol au groupement maléimide, un détergent, le Tween 20 à 0,1%, a été utilisé lors des étapes de greffage. Les résultats révèlent une augmentation très significative de la fluorescence pour la condition « Elactiv' + N-(5-fluorescéinyl) maléimide » confirmant la réaction entre la fonction thiol libre d'Elactiv' et le groupement maléimide couplé au fluorophore (**Figure 83**). En revanche, l'intensité de fluorescence pour la condition « DGL-G3 + Elactiv' + N-(5-fluorescéinyl) maléimide » est très faible et identique aux contrôles négatifs correspondant aux conditions « N-(5-fluorescéinyl) maléimide seul » et « DGL-G3 + N-(5-fluorescéinyl) maléimide ». Ce qui suggère qu'Elactiv' ne se greffe pas sur le groupement maléimide dans ces conditions.

En présence de Tween 20 à 0,1 %, une augmentation très significative de la fluorescence pour la condition « Elactiv' + N-(5-fluorescéinyl) maléimide » est également observée, confirmant la réaction entre la fonction thiol libre d'Elactiv' et le groupement maléimide couplé au fluorophore (**Figure 83**). De plus, l'intensité de fluorescence pour la condition « DGL-G3 + Elactiv' + N-(5-fluorescéinyl) maléimide » est beaucoup plus importante comparativement aux contrôles négatifs, confirmant ainsi la réaction entre la fonction thiol libre d'Elactiv' et le groupement maléimide couplé au fluorophore. Par conséquent, le Tween 20 à 0,1% permet de débobiner la protéine Elactiv' et ainsi rendre accessible sa fonction thiol libre au N-(5-fluorescéinyl) maléimide.

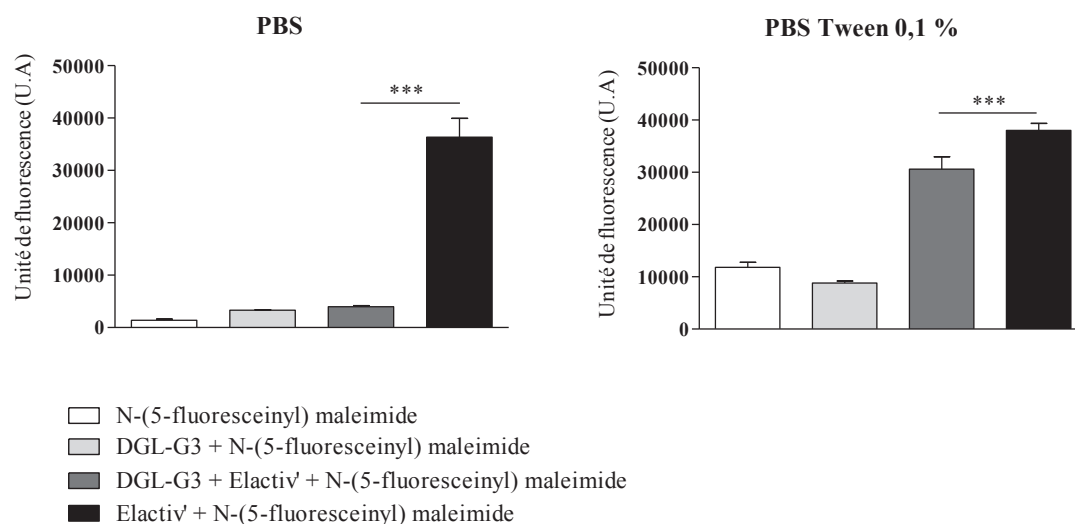


Figure 83: Validation du greffage de la protéine Elactiv' sur le groupement maléimide du NHS-C4 maléimide en utilisant un fluorophore, le N-(5-fluoresceinyl) maléimide. Les DGL-G3 et Elactiv' sont adsorbés sur une microplaque standard à une concentration finale de 10 µg/ml dans du PBS, 2h à 4°C. Après rinçage de la microplaque au PBS ou PBS Tween 0,1%, le N-(5-fluoresceinyl) maléimide est greffé à une concentration finale de 0,5 mg/ml dans du PBS, 30 min à température ambiante. Après rinçage, mesure de la fluorescence à 492 nm et 518 nm pour des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectives. Les données représentent la moyenne ± SEM (n=3). Une ANOVA à un facteur suivie d'un test *post hoc* Newman-Keuls est effectuée pour la détermination des valeurs de p. *** $p < 0.001$.

Maintenant que nous avons démontré que la réaction, entre la fonction thiol libre d'Elactiv' et le groupement maléimide du N-(5-fluoresceinyl) maléimide, était possible en présence de Tween 20 à 0,1%, nous avons voulu valider ce résultat avec le bras espaceur de l'unité hybride : le NHS-C4-maléimide. Une gamme de Tween 20 de 0,1 à 1% a été utilisée au cours de l'assemblage de l'unité hybride. Les résultats du test ADECA montrent une diminution du pourcentage résiduel d'amines suite au greffage du NHS-C4-maléimide à la surface des DGL-G3 (**Tableau 8**). En revanche, le greffage d'Elactiv' sur le NHS-C4-maléimide n'entraîne pas d'augmentation du signal en présence de Tween 20. Ce détergent n'est pas compatible avec le test ADECA et ne permet pas de répondre à notre question initiale, à savoir si la réaction a lieu entre la fonction thiol libre d'Elactiv' et le groupement maléimide du bras espaceur. Suite à cet échec concernant l'assemblage de l'unité hybride, et toujours dans la perspective de développer une matrice 3D, nous nous sommes tournés vers une stratégie différente permettant d'aboutir à un hydrogel composite DGL/Elactiv' en se focalisant uniquement sur une chimie des amines présentes à la fois à la surface des DGL et dans la séquence d'Elactiv'.

Pourcentage résiduel d'amines	Concentration Elactiv'							
Concentration NHS-C4-Maléimide	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
0 mg/ml	100,0	104,4	122,1	124,4	67,5	79,6	84,0	78,9
0,028 mg/ml	98,7	100,0	110,4	112,4	69,7	70,2	69,6	70,1
0,28 mg/ml	86,7	90,3	105,0	103,1	65,0	65,8	65,1	65,4
0 mg/ml	62,2	69,5	75,9	76,3	75,2	71,0	70,1	72,6
0,028 mg/ml	61,7	66,6	59,4	71,2	66,4	56,8	60,5	60,5
0,28 mg/ml	62,3	65,2	62,0	65,8	64,3	61,9	64,6	60,7

PBS
 PBS, Tween 0,1%
 PBS, Tween 0,5%
 PBS, Tween 1%

Tableau 8: Validation de l'assemblage de l'unité hybride (DGL + NHS-C4-Maléimide + Elactiv'), par un test ADECA, avec comme tampons de greffage du PBS, Tween 0,1-1% (n=1). Les DGL-G3, le NHS-C4-maléimide et Elactiv' sont greffés dans les mêmes conditions décrit dans le tableau 5, dans du PBS Tween 0,1 ; 0,5 et 1%. Les résultats sont représentés en pourcentage résiduel d'amines pour chaque condition.

VI. Hydrogel composite Elactiv'/ DGL-G3

Pour évaluer la possibilité de former des hydrogels en utilisant les capacités de réticulation liées à la forte présence de résidus lysyl- sur les DGL et la protéine Elactiv', nous avons réalisé des études préliminaires dans le but de former un hydrogel composite DGL-G3/Elactiv' (50:50), avec une architecture plus complexe afin d'augmenter ses propriétés mécaniques et fonctions biologiques. La formation de l'hydrogel composite Elactiv'/DGL-G3 a été possible grâce à la réticulation des fonctions amines des résidus lysine des DGL-G3 et de la protéine Elactiv', par l'intermédiaire d'un bras de réticulation, le polyéthylène glycol (PEG), qui possède une double fonctionnalité succinimidyl (*O,O'*-Bis[2-(*N*-Succinimidyl-succinylamino)ethyl] polyethylene glycol (NHS-PEG-NHS)). La vitesse de réticulation de l'hydrogel, par réactions successives du NHS-PEG-NHS sur les amines des DGL et Elactiv' (liaison amide), n'est que de quelques secondes.

Pour faciliter la colonisation cellulaire, la néo-vascularisation et la néo-synthèse de tissu, l'hydrogel composite est rendu poreux par une approche classique de porogène à base de microsphères de paraffine, permettant la formation de pores hétérogènes de taille comprise entre 50 et 100 μm .

VI.1. Propriétés mécaniques

Pour étudier et caractériser les propriétés mécaniques de l'hydrogel composite DGL-G3/Elactiv' contenant 1% en masse de protéine élastique, des analyses mécaniques dynamiques ont été réalisées en émergence avec une amplitude de déplacement dynamique définie à 10% et à 100 Hz.

La courbe de charge-décharge obtenue pour un cycle de compression sur l'hydrogel présente une boucle d'hystérésis entre la courbe de charge et la courbe de décharge, caractéristique d'un matériau viscoélastique (**Figure 84.A**). Cette boucle est liée au caractère dissipatif du matériau. Après analyses de la courbe de charge-décharge, le module complexe d'Young (E^*), la tangente delta ($\tan \delta$) de l'hydrogel ainsi que le rapport de l'énergie restituée au cours de la phase de décharge, ont pu être déterminés. Le module complexe d'Young traduit la résistance de l'hydrogel à la déformation mécanique tandis que la $\tan \delta$ correspond au rapport de l'énergie dissipée lors d'un cycle de compression sur le module élastique et est défini comme le facteur d'amortissement compris entre 0 (matériau élastique) et 1 (matériau visqueux).

Les résultats indiquent que le rapport de l'énergie restituée est d'environ 60% (**Figure 84.B**), le module complexe d'Young de l'hydrogel est d'environ 120 kPa (**Figure 84.C**) et la $\tan \delta$ de 0,2 (**Figure 84.D**) pour une fréquence de compression de 100 Hz. En conclusion, l'hydrogel composite DGL-G3/Elactiv' présente un comportement mécanique caractéristique d'un matériau élastique avec une faible viscosité.

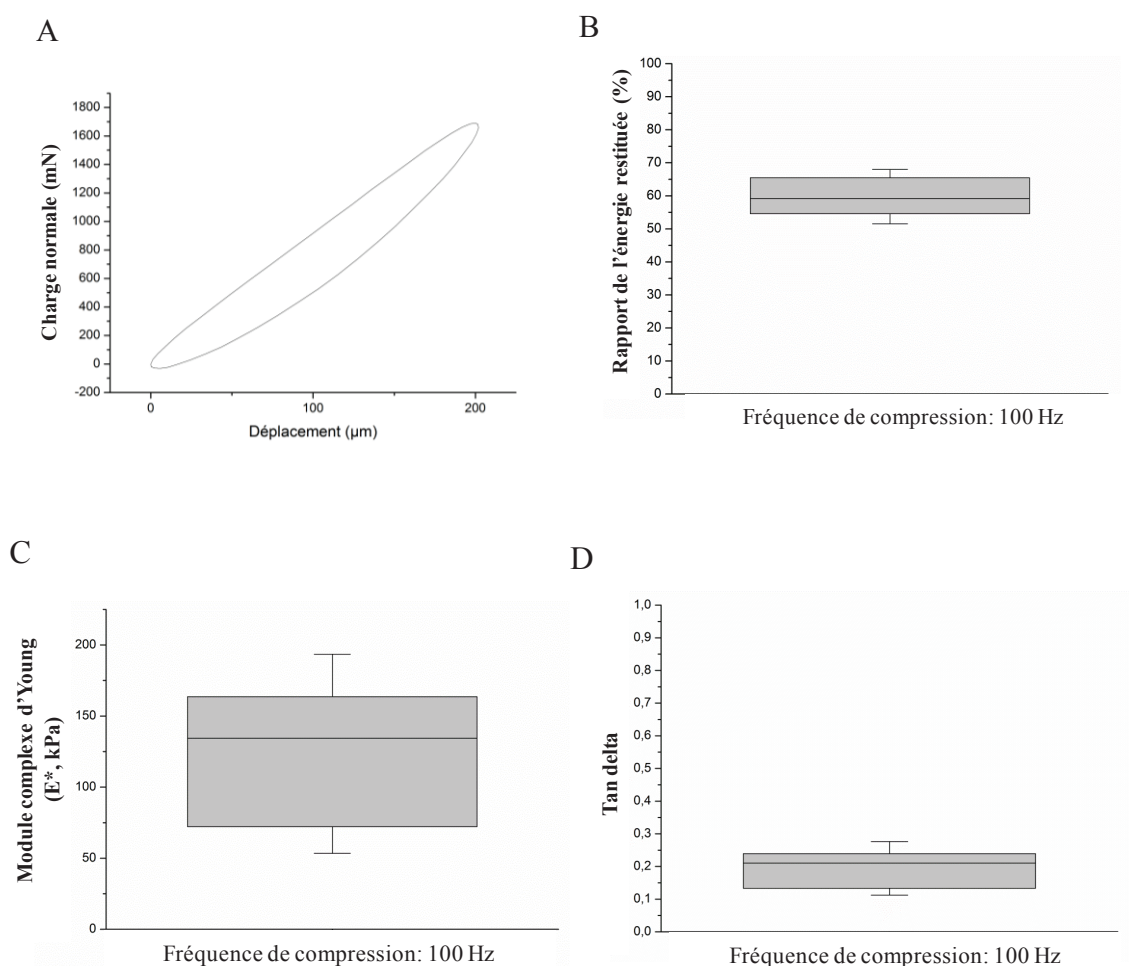


Figure 84: Analyses mécaniques dynamiques de l'hydrogel composite Elactiv'/ DGL-G3 contenant 1% en masse d'Elactiv', avec une amplitude de déplacement dynamique définie à 10% et à 100 Hz. A/ Courbe de charge-décharge obtenue pour plusieurs cycles de compression sur l'hydrogel. B/ Energie restituée par l'hydrogel après avoir subi plusieurs cycles de compression avec une fréquence appliquée de 100 Hz (n=3). C/ Module complexe d'Young (E^* , kPa) de l'hydrogel défini pour une fréquence de compression de 100 Hz appliquée sur l'échantillon au cours du test de compression (n=3). D/ $\tan \delta$ de l'hydrogel définie pour une fréquence de compression de 100 Hz appliquée sur l'échantillon au cours du test de compression (n=3).

VI.2. Morphologie des fibroblastes dermiques cultivés sur l'hydrogel composite

Dans le but d'évaluer la toxicité cellulaire de l'hydrogel composite poreux DGL-G3/Elactiv', des fibroblastes dermiques humains ont été cultivées pendant douze jours sur l'hydrogel contenant 5 mg d'Elactiv'. Les observations du cytosquelette d'actine des fibroblastes, par microscopie à épifluorescence, indique que les cellules se sont bien étalées et attachées à la surface de l'hydrogel (**Figure 85**). Les cellules ont également proliféré à la surface de l'hydrogel, en particulier au niveau des pores où les fibroblastes apparaissent confluents (**Figure 85.C**). Ces données nous indiquent une biocompatibilité satisfaisante de l'hydrogel en présence des fibroblastes dermiques humains.

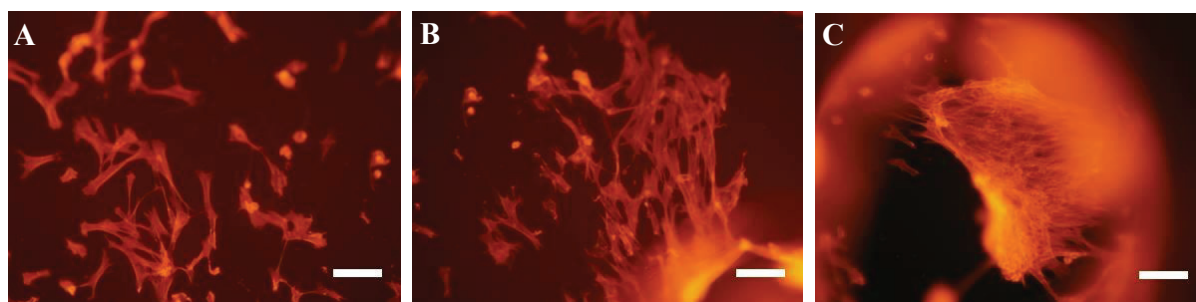


Figure 85: Observation du cytosquelette d'actine, par microscopie à épifluorescence, des fibroblastes dermiques humains cultivés sur l'hydrogel composite poreux Elactiv'/DGL-G3. Les fibroblastes dermiques sontensemencés sur l'hydrogel, contenant 5 mg de protéine Elactiv', à une densité de 10 000 cellules.cm⁻² puis cultivés pendant 12 jours. Après fixation des cellules, les réseaux d'actine sont contremarqués en utilisant la phalloïdine conjuguée à la rhodamine (orange). Les barres d'échelle indiquent 20 μm (n=1).

VI.3. Implantation de l'hydrogel composite en sous-cutanée chez la souris

Après avoir vérifié la biocompatibilité de l'hydrogel composite poreux DGL-G3/Elactiv' *in vitro*, nous avons voulu vérifier son innocuité et sa résorption *in vivo* en l'implantant pendant 3 semaines en sous-cutané chez la souris. Deux hydrogels composites de 2 mm d'épaisseur et contenant 1% en masse de protéine Elactiv' ont été implantés durant trois semaines en sous-cutané chez la souris.

Les analyses histologiques, par coloration standard Hématéine-Eosine-Safran, révèlent la présence d'une fine capsule fibro-inflammatoire au contact de l'hydrogel, localisé en-dessous de l'aponévrose, mais qui n'entoure pas la totalité de l'hydrogel (**Figure 86.A-B**). Des cellules inflammatoires telles que les macrophages, qui fusionnent pour former des « cellules géantes », et quelques granulocytes sont présents à l'intérieur des pores de l'hydrogel (**Figure 86.C**). Comme pour l'hydrogel Elactiv' seule, cette réaction inflammatoire apparaît systématiquement suite à la présence d'un corps étranger dans le tissu cutané. Une néo-vascularisation développée est visible au niveau des pores de l'hydrogel avec à l'intérieur de chaque vaisseau la présence d'une quantité importante d'hématies (**Figure 86.C-F**). Les vaisseaux sanguins permettent l'extravasation des cellules inflammatoires d'où leur colocalisation. En revanche, l'absence de lymphocytes tend à exclure toute inflammation aigüe. Toujours au niveau des pores de l'hydrogel, nous pouvons observer une néo-synthèse de MEC, avec l'infiltration de fibroblastes à l'intérieur du néo-tissu conjonctif (**Figure 86.E-G**). L'invasion cellulaire et vasculaire au sein l'hydrogel ainsi que la faible réaction inflammatoire générée permettent de confirmer la biocompatibilité de l'hydrogel composite poreux Elactiv'/DGL-G3. De plus, nous pouvons observer que les macrophages phagocytent de façon significative les contours des pores de l'hydrogel (**Figure 86.F-G**). En conclusion, l'hydrogel composite poreux Elactiv'/ DGL-G3 est biocompatible et biodégradable.

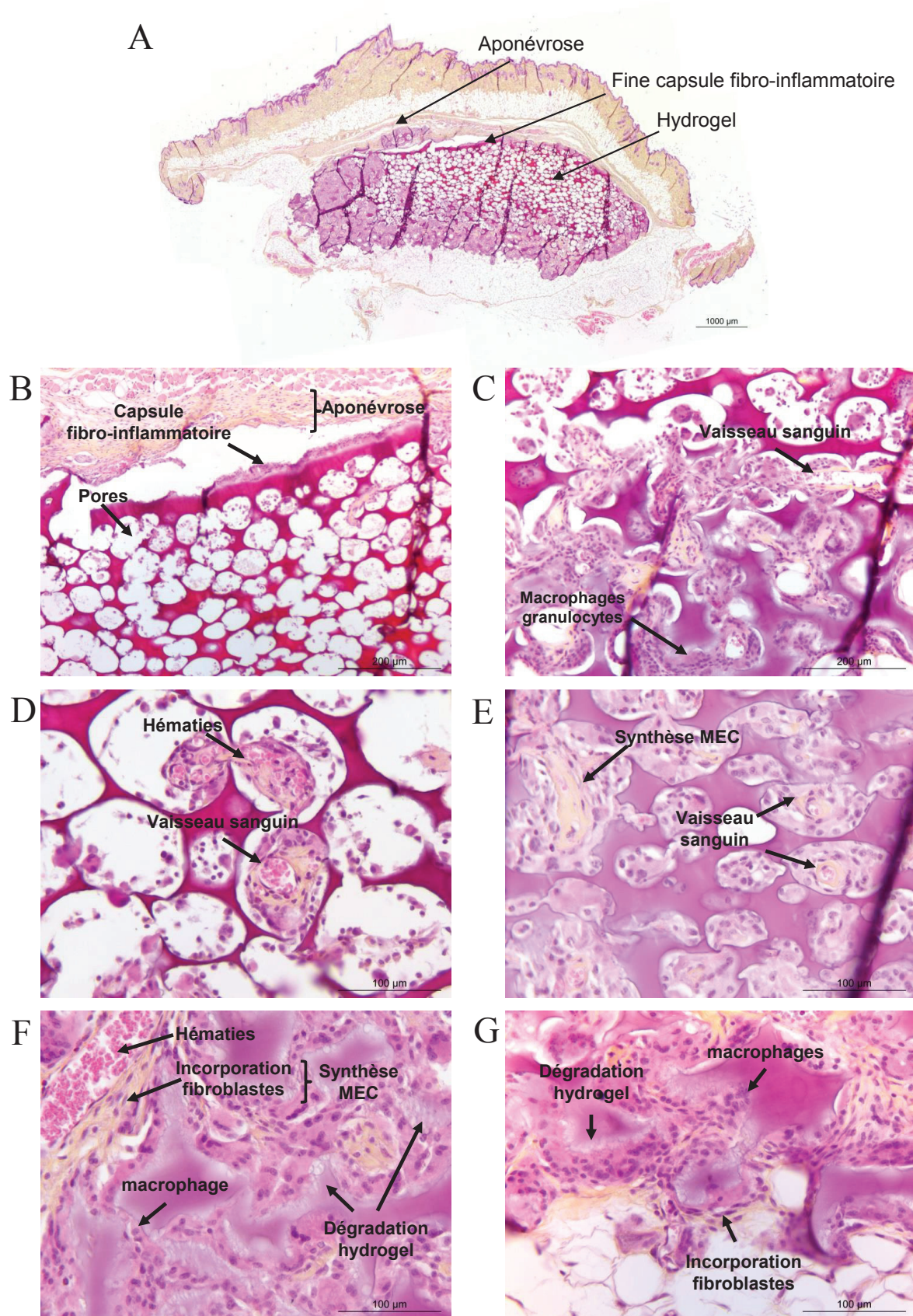


Figure 86: Implantation de l'hydrogel composite Elactiv'/ DGL-G3 poreux en sous-cutanée chez la souris (n=1) pendant 3 semaines. Coloration hémateïne-Eosine-Safran du tissu cutané.

DISCUSSION

Les peptides élastiques décrits dans la littérature sont essentiellement des peptides chimériques au sein desquels des séquences bioactives exogènes, spécifiques d'autres protéines matricielles, ont été ajoutées dans le but d'améliorer leurs fonctions biologiques. Ces peptides chimériques présentent des propriétés supplémentaires qui ne sont pas retrouvées dans la tropoélastine humaine (TE) et les éloignent ainsi de la fonction native de la protéine. L'objectif de notre étude était de développer une protéine élastique avec une structure moins complexe afin de mimer le plus justement possible les propriétés de la TE et de répondre à un besoin de standardisation des propriétés élastiques dans des modèles d'ingénierie tissulaire. Pour cela nous nous sommes inspirés des propriétés uniques de la TE inhérentes à son comportement mécanique élastique intrinsèque, sa capacité d'auto-assemblage et ses propriétés biologiques, tout en essayant de soustraire les paramètres indésirables de cette protéine et notamment son caractère pro-inflammatoire dû à une multitude de peptides bioactifs libérés suite à sa dégradation et l'hétérogénéité de ses isoformes qui sont tissus-spécifiques (Heim, Pierce *et al.* 1991). Dans cette partie nous discuterons des propriétés d'Elactiv' sous un angle de comparaison avec la TE ou d'autres ELP déjà décrits.

I. Comparaison des propriétés physico-chimiques d'Elactiv' avec la TE et les ELP, liées à l'auto-assemblage et au caractère élastique

I.1. Structure et coacervation

La protéine Elactiv' a été conçue en respectant la structure globale de la TE, à savoir une alternance de domaines hydrophobes et de réticulation (Wise and Weiss 2009). Contrairement à la TE, les séquences des domaines hydrophobes et de réticulation d'Elactiv' sont constituées des mêmes unités de répétition d'acides aminés, à savoir les motifs VGVAPG et VGVLPG pour les domaines hydrophobes, et le motif AAKAAAKAAK pour les domaines de réticulation. Dans la structure primaire d'Elactiv', les domaines hydrophobes sont trouvés en plus grande proportion. Elactiv' est en revanche la seule protéine élastique connue à ce jour, qui conserve intégralement le domaine 36 de la TE comprenant le pont disulfure connu pour faciliter l'assemblage des fibres élastiques (Nonaka, Sato *et al.* 2014). La conservation de ce domaine augmente ainsi le potentiel biomimétique d'Elactiv'.

La régularité dans les séquences d'acides aminés des différents domaines d'Elactiv' et la présence d'un plus grand nombre de domaines hydrophobes, conduisent à des variations dans le repliement d'Elactiv', en particulier au niveau des structures secondaires, comparé à la TE. Les spectres de dichroïsme circulaire révèlent qu' Elactiv' se replie majoritairement sous la forme d'une hélice gauche de type polyproline II (PPII) de façon similaire à la TE (Bochicchio and Pepe 2011). Elactiv' forme également des hélices α mais en plus faible nombre que la protéine native. Cette diminution de la quantité d'hélices α résulte du nombre plus faible de domaines de réticulation, connus pour s'organiser spontanément en hélices α (Muiznieks and Weiss 2007), et contribue à la flexibilité d'Elactiv', apportée par les domaines hydrophobes. L'arrangement contextuel des domaines hydrophobes au sein de la structure primaire d'Elactiv' et leur liberté de mouvements, apporté par les résidus de proline et de glycine, facilite l'agrégation entre les domaines hydrophobes proximaux, similaire à la TE (Toonkool, Jensen *et al.* 2001). Les résidus de proline et de glycine, contenus dans les motifs hydrophobes VGVAPG et VGVLPG, participeraient conjointement, mais pour des raisons opposées, à la flexibilité d'Elactiv'. En effet, la glycine favorise la mobilité d'Elactiv', lui permettant d'adopter diverses conformations. En revanche, la proline favorise la rigidité, empêchant la formation de structures secondaires stables (Roberts, Dzuricky *et al.* 2015). Par conséquent, l'agrégation des domaines hydrophobes d'Elactiv' *in vitro* est rendue possible par leur flexibilité.

Ce phénomène d'auto-agrégation est également dépendant de l'environnement, en particulier de la température de la solution. Les mesures de diffusion dynamique de la lumière révèlent que la protéine Elactiv' est sensible à la chaleur et subit une transition de phase inverse semblable à la TE et aux peptides élastiques (Meyer and Chilkoti 1999) (Reguera, Urry *et al.* 2007). En effet, en-dessous de 30°C (correspondant à la température de transition, Tt), Elactiv' est soluble dans le PBS, alors qu'au-dessus de cette température, la protéine coacerve et forme de petits agrégats dont le diamètre augmente avec l'augmentation de la température et atteint une taille maximale à 60°C, indiquant la fin du processus de coacervation. Les mesures de DLS lors du refroidissement de la solution d'Elactiv' de 60°C à 20°C, c'est-à-dire en-dessous de la Tt, indique que les agrégats retrouvent leur taille originelle et, par conséquent, prouve une transition réversible complète de la solution d'Elactiv', similaire à la TE.

Cette capacité intrinsèque de coacervation, spécifique à la TE, doit être requise par les peptides élastiques dans le cadre d'applications biomédicales, en particulier dans les systèmes d'administration de médicaments et dans les technologies d'ingénierie tissulaire (Yeo, Aghaei-Ghareh-Bolagh *et al.* 2015). La validation de cette capacité par Elactiv' lui permet ainsi d'être utilisée dans diverses applications. Néanmoins, la température de transition d'Elactiv' est plus basse que celle de la TE dans les conditions physiologiques, 30°C pour Elactiv' contre 37°C pour la protéine native. Cette diminution est notamment liée à la plus grande proportion de domaines hydrophobes dans la structure primaire d'Elactiv'. La température de transition est plus faible et la coacervation favorisée pour les espèces possédant un plus grand nombre de domaines hydrophobes (Toonkool, Jensen *et al.* 2001) (Jensen, Vrhovski *et al.* 2000). De plus, diminuer le nombre de proline ou augmenter l'écart entre deux résidus de proline au sein des domaines hydrophobes conduit à une variation importante du processus de coacervation dans les conditions physiologiques (Muiznieks and Keeley 2010). En conséquence, le nombre de résidus de proline et leur arrangement très régulier au sein des motifs hydrophobes d'Elactiv' peut également favoriser la coacervation. La séquence des motifs hydrophobes, l'hydrophobicité moyenne d'un résidu d'acide aminé et l'arrangement contextuel des domaines hydrophobes affecte également la capacité de coacervation *in vitro* (Yeo, Keeley *et al.* 2011). Le processus de coacervation a été reconnu pour être la première grande étape de l'assemblage des fibres élastiques (Narayanan, Page *et al.* 1978).

Bien que les domaines hydrophobes soient essentiels pour la séparation de phase dans la coacervation, la plupart d'entre eux ne sont pas capables de promouvoir la stabilité du coacervat. Inversement, les domaines de réticulation, en particulier les domaines de type KA, dans lesquels les résidus de lysine destinés à la réticulation sont situés dans les séquences de polyalanine, ont généralement été considérés pour être relativement stables et passifs dans le processus de coacervation. Néanmoins, de récentes études ont démontré l'importance des domaines de réticulation, à la fois dans la régulation et l'induction de l'auto-assemblage des peptides élastiques, et l'importance des chaînes latérales des lysines pour prévenir, dans ces domaines, la formation d'agrégats protéiques, dits amyloïdes (Reichheld, Muiznieks *et al.* 2014). Les domaines de réticulation sont structurellement labiles pendant la coacervation et s'adaptent à leur environnement et leur état agrégé.

Ceci suggère l'importance des domaines de réticulation dans la structure primaire d'Elactiv' étant donné leur faculté à affecter indirectement les domaines hydrophobes et, par conséquent, la capacité de la protéine à coacerver.

I.2. Auto-assemblage multi-échelle

Les études de microscopie électronique ont permis de déterminer si Elactiv' était capable de suivre les mêmes étapes d'auto-assemblage *in vitro* que la TE. Les observations par microscopie électronique à transmission des coacervats d'Elactiv', obtenus au-dessus de la Tt, révèlent qu'aux faibles concentrations, Elactiv' forme des petites sphères individuelles creuses qui, à plus forte concentration, fusionnent et coalescent donnant des filaments perlés de différentes formes géométriques. Les sphères de TE ne coalescent pas au hasard puisque la géométrie des sphères fusionnées dicte la distribution spatiale éventuelle de l'élastine (Tu, Wise *et al.* 2010). Au cours du processus de coacervation, Elactiv' suit des étapes distinctes semblables à celles suivies par la TE, à savoir la formation de petites sphères suivie de leur agrégation pour former de plus grandes sphères, la fusion et la coalescence des sphères pour donner une structure en filaments perlés (Tu, Wise *et al.* 2010).

L'évolution des agrégats d'Elactiv' vers une architecture plus complexe, sous la forme d'un hydrogel composé exclusivement d'Elactiv' réticulé par de la génipine, permet d'accéder aux paramètres mécaniques de cette structure tridimensionnelle, mais également d'analyser sa toxicité cellulaire et son innocuité *in vivo*. L'analyse des agrégats d'Elactiv', par microscopie électronique à balayage, révèle qu'en présence de génipine, les agrégats forment un réseau très dense, où les sphères, en plus d'être interconnectées comme des billes sur une chaîne, forment des structures semblables à des fibres avec un diamètre (0,2 μm) similaire à ceux des fibres élastiques *in vivo* (Ushiki 1992). Quand la concentration en Elactiv' augmente pour une même concentration en génipine, la plupart des molécules d'Elactiv' ont déjà coalescées pour former un hydrogel poreux. En revanche, la taille des pores (entre 1 et 5 μm) ne laisse pas envisager la colonisation passive de telles structures par des cellules mésenchymateuses. Les tests d'indentation réalisés à la surface de l'hydrogel Elactiv'-génipine révèlent le caractère élastique de l'hydrogel, par un comportement mécanique similaire quel que soit la charge normale appliquée, et par la perte d'un faible pourcentage d'énergie par cycle de charge et de décharge.

Il a été démontré que la réponse mécanique de la TE repose sur un mécanisme dynamique entre les domaines hydrophobes de la TE et les molécules de solvant (Muiznieks, Weiss *et al.* 2010). En effet, en absence d'eau, la flexibilité des chaînes carbonées de la TE est réduite, ce qui affecte son élasticité.

En comparaison du module d'Young de la peau *in vivo* (entre 10 et 20 kPa), l'hydrogel Elactiv' (**Figure 87**) montre une plus grande rigidité (module d'Young de 1,4 à 1,5 MPa) du même ordre de grandeur que les peptides élastiques EP20-24-24, composés des exons 20–21–23–24–21–23–24 du gène *ELN* de la TE (He, Miao *et al.* 2012). Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation de la génipine, qui s'est avérée être un agent de réticulation efficace, augmentant la rigidité et la résistance à la traction de divers matériaux, tels que des matrices à base de collagène et d'*elastin-like recombinamer* pour l'ingénierie tissulaire des tissus mous (Kinikoglu, Rodriguez-Cabello *et al.* 2011), de gels de peptides élastiques pour la régénération osseuse (Hrabchak, Rouleau *et al.* 2010) ou encore d'hydrogels de chitosan pour l'ingénierie tissulaire (Gao, Gan *et al.* 2014).

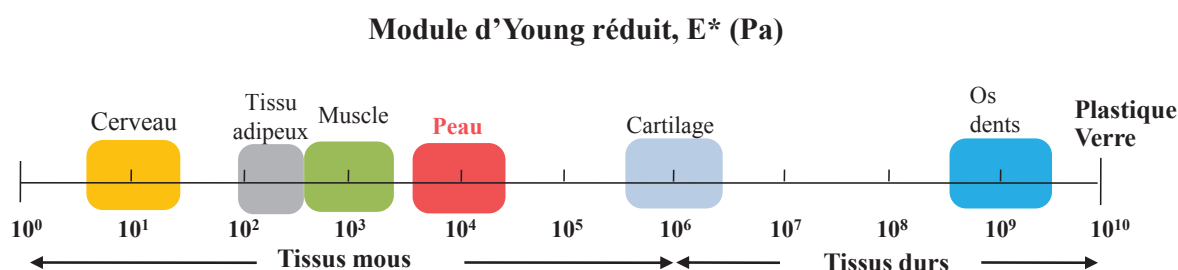


Figure 87: Echelle du module d'élasticité (module d'Young réduit E^*) permettant de classer les tissus biologiques du plus mou (le cerveau) au plus rigide (les os et les dents).

I.3. Intégration dans les fibres élastiques

Elactiv' étant capable de s'auto-assembler à diverses échelles, nous avons ensuite voulu savoir si cette protéine, ajoutée en solution dans le milieu de culture de fibroblastes dermiques sains, était capable d'exercer la fonction première de l'élastine, à savoir de former des structures fibrillaires.

En incubant Elactiv' avec des fibroblastes dermiques de J5 à J8 post-confluence, nous avons pu observer que la protéine était capable de s'incorporer au sein des fibres élastiques néo-synthétisées, et de former de petits agrégats au sein de la MEC (**Figure 88.B**), dont la taille apparaît augmenter en fonction de la concentration en protéine dans le milieu de culture. Toutefois, lorsque la concentration en protéine est augmentée, Elactiv' n'apparaît plus incorporée dans les fibres élastiques néo-synthétisées. Seuls de gros agrégats d'Elactiv' sont visibles, ce qui suggère que la taille des agrégats est trop importante pour qu'ils soient pris en charge par les protéines microfibrillaires afin d'être déposés sur les microfibrilles.

Il a été démontré que les fibuline-4 et -5 empêchent la croissance des coacervats au-delà de la taille observée *in vivo*, et favorisent leur regroupement en un réseau organisé (Cirulis, Bellingham *et al.* 2008). Dans cette étude, la protéine Elactiv' a été ajoutée cinq jours après la confluence et laissée au contact des cellules pendant trois jours. A cinq jours post-confluence, les cellules ont déjà synthétisé les fibres élastiques, et l'expression des protéines microfibrillaires, dont les fibuline-4 et -5, est diminuée car la sécrétion de TE par les fibroblastes est réduite. De plus, le temps de contact entre Elactiv' et les cellules est trop court pour induire une augmentation de l'expression des fibuline-4 et -5, nécessaire pour la prise en charge des gros agrégats d'Elactiv'.

Par ailleurs, l'intégration d'Elactiv' dans les fibres de TE préformées et la formation des agrégats d'Elactiv' ne se produisent plus en présence d'un inhibiteur de la LOX (**Figure 88.C**). Ceci indique ce phénomène est actif car il nécessite l'activité enzymatique de la LOX. Dans le processus d'assemblage des fibres élastiques, la TE sécrétée coacerve à la surface de la cellule sur ses récepteurs spécifiques dont l'EBP et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Wise and Weiss 2009). Deux hypothèses ont été émises quant à la suite des événements : la première hypothèse est que les coacervats de tropoélastine se déposeraient sur les microfibrilles avant d'être réticulés par les lysyl-oxydases (Nivison-Smith and Weiss 2011); alors que la deuxième hypothèse est que les coacervats seraient d'abord réticulés dans l'espace extracellulaire avant d'être déposés sur les microfibrilles (Silva, Vilela *et al.* 2014). La deuxième hypothèse est plus en adéquation avec ce que nous observons pour la protéine Elactiv' car les agrégats d'Elactiv' que nous avons pu observer dans la MEC ont besoin de la LOX pour leur formation.

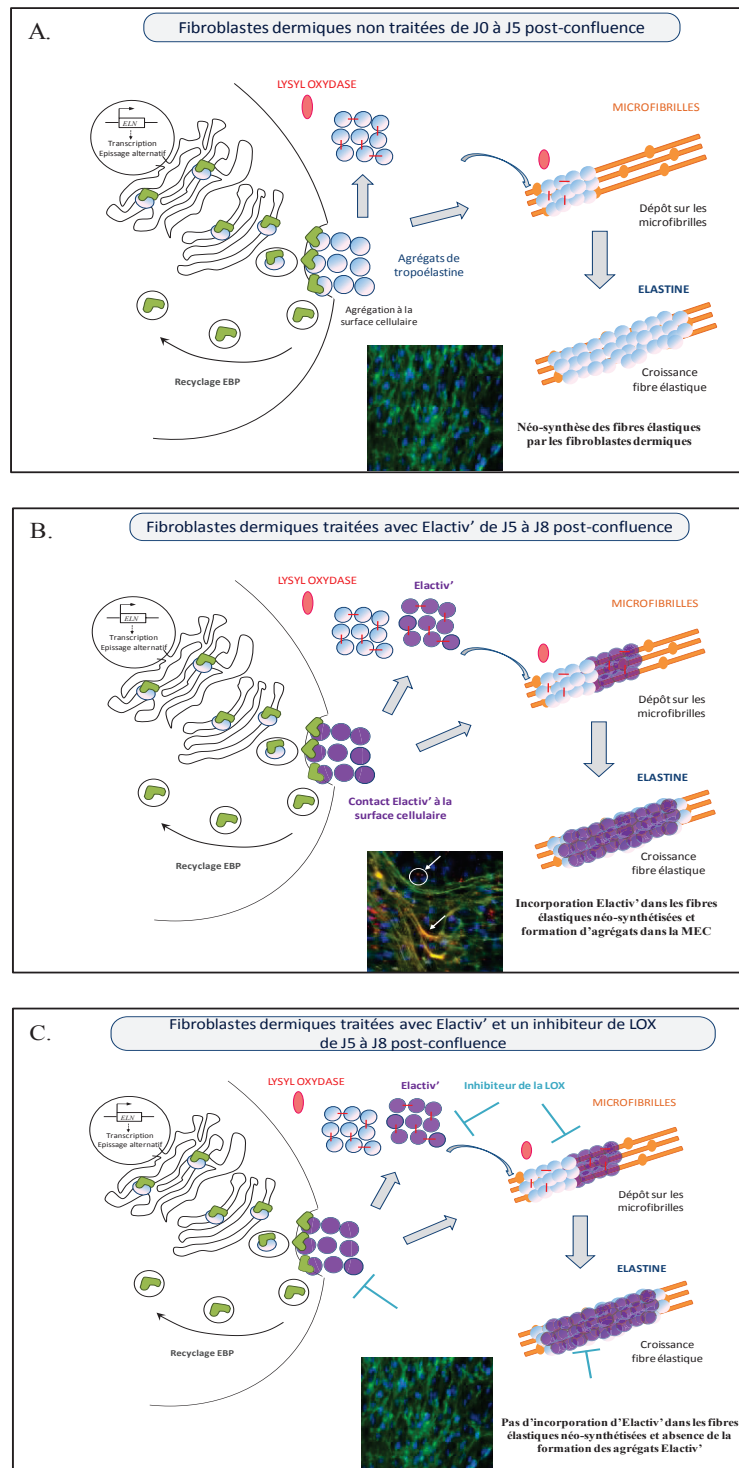


Figure 88: Mécanisme d'incorporation d'Elactiv' dans les fibres élastiques néo-synthétisées par les fibroblastes dermiques sains. A/ Néo-synthèse des fibres élastiques par les fibroblastes dermiques de J0 à J5 post-confluence. B/ Traitement des fibroblastes dermiques avec Elactiv' de J5 à J8 post-confluence. C/ Traitement des fibroblastes dermiques avec Elactiv' et un inhibiteur de la LOX de J5 à J8 post-confluence.

II. Activités biologiques d'Elactiv'

Pendant longtemps, les effets des peptides élastiques ont été exclusivement imputés aux interactions entre les motifs hydrophobes, du type XGXXPG, et l'EBP (*Elastin Binding Protein*) à la surface cellulaire (Hinek, Boyle *et al.* 1992) (Hinek and Rabinovitch 1994). Plus récemment, il a été montré que la région C-terminale de la TE peut se lier aux cellules par l'intermédiaire du motif GRKRR et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Bax, Rodgers *et al.* 2009), pouvant induire des signaux intracellulaires différents de ceux délivrés par les motifs hydrophobes (Broekelmann, Kozel *et al.* 2005). Ainsi, Elactiv' comportant d'une part les motifs VGVAPG-VGVLP et d'autre part le motif GRKRR du domaine 36 de la TE, serait capable de se lier aux deux récepteurs majeurs de la TE et de transduire des signaux intracellulaires de façon quasi-similaire à la protéine native.

II.1. Prolifération

En premier lieu, nous avons évalué l'effet d'Elactiv' sur la prolifération des fibroblastes dermiques sains en phases homogène et hétérogène. La prolifération des cellules en phase hétérogène est identique pour Elactiv' et le peptide VGVAPG, alors qu'en phase homogène une augmentation significative de la prolifération cellulaire, en présence d'Elactiv', est observée 10 jours après ensemencement et ce de façon similaire au peptide VGVAPG. Cette différence entre la prolifération en phase homogène et hétérogène peut s'expliquer par la différence de conformation de la protéine Elactiv' dans les deux essais. En effet, lorsqu'Elactiv' s'adsorbe à la surface de la plaque de culture, sa conformation pourrait ne plus présenter les séquences bioactives (VGVAPG et GRKRR) et ainsi empêcher l'interaction avec les cellules par l'intermédiaire des molécules transmembranaires (EBP et intégrine $\alpha_v\beta_3$). En revanche, lorsqu'Elactiv' est ajoutée en solution dans le milieu de culture, sa conformation moins figée pourrait lui permettre d'exposer les séquences bioactives dans le but d'induire des réponses cellulaires. De façon globale, ces résultats soulignent la biocompatibilité d'Elactiv' avec un comportement similaire aux peptides élastiques VGVAPG (Chatron-Colliet, Lalun *et al.* 2015). En effet, en se liant à l'EBP, les peptides VGVAPG activent la voie de transduction du signal MEK/ERK $\frac{1}{2}$, qui active à son tour différentes cyclines kinases, en particulier les cyclines D, A et E, stimulant la prolifération des fibroblastes (Mochizuki, Brassart *et al.* 2002; Korotayev, Chaussepied *et al.* 2008).

II.2. Adhérence

La fonctionnalité des motifs VGVA/LPG et GRK RK de la protéine Elactiv' a été évaluée par des tests d'adhésion cellulaire sur des surfaces recouvertes d'Elactiv' en présence d'un inhibiteur de l'EBP, le L-lactose (Mecham, Hinek *et al.* 1989), et d'un anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'adhérence des fibroblastes dermiques est diminuée sur Elactiv' en présence de chacun des inhibiteurs avec, néanmoins, un effet légèrement plus prononcé (mais non significatif) avec le L-lactose qu'avec l'anticorps bloquant anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette différence peut s'expliquer par la présence d'un grand nombre d'unités de répétition VGVA/LPG dans la structure primaire d'Elactiv' comparé au motif unique GRK RK. Lorsque les deux inhibiteurs sont ajoutés dans le milieu de culture, la diminution de l'adhésion des fibroblastes est encore plus marquée avec un effet cumulatif des inhibiteurs sur l'adhésion cellulaire. Ces résultats confirment la contribution des motifs VGVA/LPG et GRK RK d'Elactiv' dans l'adhésion des fibroblastes dermiques et, par conséquent, soulignent leur potentiel biologique. De plus, l'augmentation de l'expression protéique de la sous-unité α_v de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ après 48h de culture sur des surfaces recouvertes d'Elactiv' conforte la fonctionnalité du motif GRK RK présent à l'extrémité C-terminale d'Elactiv'.

II.3. Induction des MMP et dégradation

Pour faciliter la migration et la prolifération des cellules sur des surfaces recouvertes d'Elactiv', la sécrétion des MMP est indispensable pour dégrader la matrice d'Elactiv'. Nous nous sommes intéressés à la MMP-2 car elle a été décrite pour jouer un rôle important dans la physiopathologie des tissus mous tels que la peau (Creemers, Jansen *et al.* 1998). La présence d'Elactiv' dans le milieu de culture de fibroblastes sains entraîne une légère augmentation de l'expression de la pro-MMP2 mais pas celle de sa forme activée. Toutefois, cette légère augmentation de la pro-MMP2, en présence d'Elactiv', ne conduit pas à une augmentation de l'expression de la MMP-2, dans des conditions spécifiques à son activation. Les cinétiques de dégradation d'Elactiv' par la MMP-2 révèlent qu'Elactiv' est moins dégradée au cours du temps que la TE recombinante, soulignant la stabilité d'Elactiv'. Des études antérieures ont montré que les peptides synthétiques VGVAPG augmentent la production de MMP-2 par les fibroblastes dermiques en culture, selon un mécanisme post-transcriptionnel impliquant la phospholipase D (Huet, Brassart *et al.* 2001). Contrairement à ces peptides, Elactiv' n'est pas impliquée dans ce mécanisme et n'est donc pas susceptible de déclencher une inflammation.

Aucune forme de la MMP-9 n'est observée dans les fibroblastes sains traités par Elactiv'. La MMP-9 n'est pas exprimée dans les fibroblastes sains mais est plutôt associée aux fibroblastes transformés de type fibrosarcomes comme la lignée HT1080 (Morodomi, Ogata *et al.* 1992). Toutefois la TE est reconnue pour être un substrat de cette enzyme et présente pas moins de 63 sites de clivage (Heinz, Jung *et al.* 2010). De plus, une augmentation de l'expression de la pro-MMP9 a été observée dans les tumeurs de mélanome traitées avec des peptides élastiques de type κ -élastine (Devy, Duca *et al.* 2010). Il a été démontré que l'expression des MMP-2 et -9 est augmentée dans la sténose aortique (Helske, Kupari *et al.* 2007). De plus, la MMP-9 est également impliquée dans la rupture myocardique, après un infarctus de myocarde (Romanic, Harrison *et al.* 2002), et dans le photo-vieillessement de la peau (Kahari and Saarialho-Kere 1997). Ainsi, Elactiv' pourrait ne pas conduire au développement de ces pathologies dans le cas où elle serait utilisée en tant qu'agent thérapeutique ou en ingénierie tissulaire.

Par ailleurs, Elactiv' est dégradée par la MMP-12 au cours du temps de façon similaire à la TE, dans laquelle 86 sites de clivage ont été identifiés (Heinz, Jung *et al.* 2010). Cette dégradation se fait par l'intermédiaire des motifs VGVAPG, reconnus pour être clivés par la MMP-12 (Taddese, Weiss *et al.* 2009). Il a également été démontré que des surfaces fonctionnalisées avec la TE présentent une augmentation de la sécrétion de la MMP-12, et que cette réponse se fait par l'intermédiaire de l'EBP et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Almine, Wise *et al.* 2013).

La sensibilité d'Elactiv' pour les MMP-2 et -12 et la structure particulière des agrégats d'Elactiv' en petites sphères creuses, observée par microscopie électronique à transmission, laisse envisager la possibilité d'utiliser les coacervats d'Elactiv' comme des microcapsules dans lesquels des molécules médicamenteuses pourront être piégées puis libérées de façon contrôlée, par l'action de protéases, dans le tissu cible.

II.4. Morphologie cellulaire et différenciation myofibroblastique

Au sein des tissus, les cellules sentent et répondent aux propriétés mécaniques spécifiques de leur microenvironnement à travers les molécules transmembranaires qui les transduisent en signaux intracellulaires informatifs pour la cellule (**Figure 89.A**). Au cours de ces dix dernières années, de nombreuses recherches ont été menées concernant le rôle de la rigidité du substrat sur le comportement des cellules. Quand une cellule d'un tissu mou est cultivée sur un support rigide (par exemple une plaque de culture standard) qui n'a pas les propriétés mécaniques du tissu natif, la cellule génère de grandes forces de traction qui conduisent à la formation d'adhésions focales matures et à la réorganisation du cytosquelette d'actine avec d'abondantes fibres de stress (**Figure 89.B**), suite à l'action de la myosine II. Ces changements dans l'organisation du cytosquelette sont importants car le cytosquelette est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation, qui transfèrent la rétroaction mécanique en réponses chimiques susceptibles de modifier le phénotype cellulaire.

Ainsi, nous avons voulu savoir si la fonctionnalisation des surfaces avec la protéine Elactiv' pouvait entraîner une modification dans l'organisation du cytosquelette d'actine des fibroblastes dermiques. Après 48h de culture, les observations des réseaux d'actine nous permettent de conclure qu'Elactiv' n'influe pas sur la morphologie cellulaire.

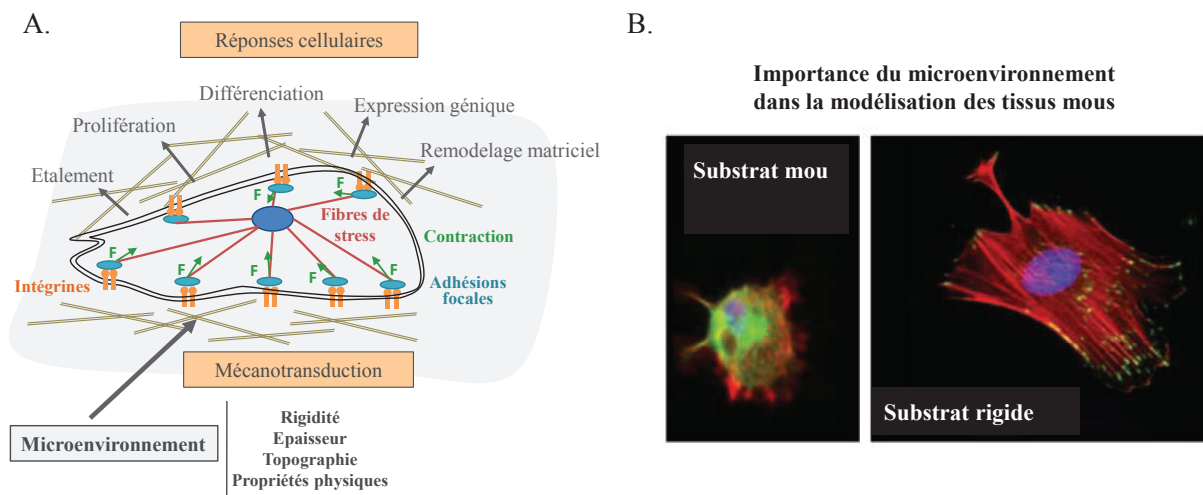


Figure 89: Importance des propriétés biomécaniques du microenvironnement dans le développement des tissus mous. A/ Principe de la mécanotransduction. B/ Influence de la rigidité du substrat sur l'organisation des microfilaments d'actine d'une cellule cultivée *in vitro* (adaptée de Discher, Mooney *et al.* 2009).

Par ailleurs, des études ont démontré que les propriétés mécaniques du microenvironnement jouent un rôle dans l'induction biochimique. La configuration stérique de certaines molécules, dont les facteurs de croissance, peut être modifiée par la nature de l'ancrage de la cellule à son environnement. En effet, dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, un modèle de cage à facteur de croissance a été proposé (Wipff, Rifkin *et al.* 2007) : lors de la contraction de réseau actine-myosine de la cellule sur un substrat rigide, la cage enfermant le facteur de croissance TGF- β s'ouvre, et le TGF- β peut se fixer à son récepteur, conduisant à la différenciation de la cellule en myofibroblaste (**Figure 90.A**). En revanche, si le substrat est trop mou, la contraction actine-myosine, ne permettra pas l'ouverture de la cage, et le fibroblaste ne se différenciera pas en myofibroblaste (**Figure 90.B**).

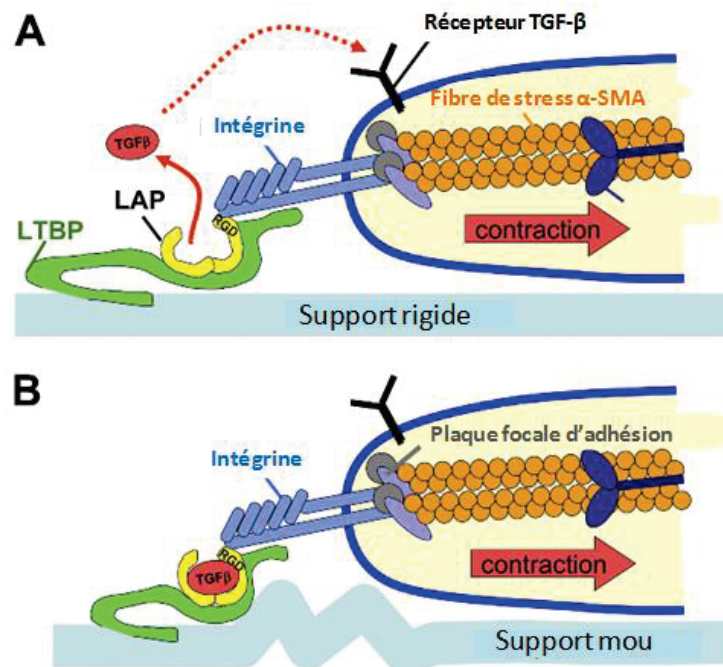


Figure 90: Modèle de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes sous l'action du TGF- β en fonction de la rigidité du support. Le précurseur latent du TGF- β (LTGF- β pour *Latent TGF- β*) requiert une maturation pour se fixer au récepteur et induire une réponse cellulaire. Le LTGF- β est constitué d'un peptide signal de sécrétion dans sa région N-terminale, d'une région centrale appelée LAP (pour *Latency-Associated Peptide*), et d'une région C-terminale constituant le TGF- β bioactif après maturation. Les peptides LAP confèrent la latence du complexe alors que les LTBP (*Latent TGF- β binding protein*) permettent la fixation du TGF- β à la MEC et son stockage. A/ Libération possible du TGF- β sur un support rigide conduisant à la différenciation myofibroblastique. B/ Libération impossible du TGF- β sur un support mou ne permettant pas la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (adaptée de Wipff, Rifkin *et al.* 2007).

Ainsi, nous avons voulu savoir si la fonctionnalisation des surfaces avec la protéine Elactiv' pouvait influencer la différenciation des fibroblastes sains en myofibroblastes, par la détection de l'expression de l'alpha-actine du muscle lisse (α -SMA). Le nombre quasi-similaire de myofibroblastes et l'expression identique de l' α -SMA après 48h de culture en présence d'Elactiv' comparé au verre, à la BSA et au collagène de type I, indiquent que la protéine Elactiv' n'influe pas sur la différenciation myofibroblastique tandis que la différenciation myofibroblastique est diminuée sur des supports élastiques (Kloxin, Benton *et al.* 2010). Cette différence observée pour la protéine Elactiv' peut s'expliquer par la conformation de la protéine qui n'est pas optimale lorsqu'elle est adsorbée sur une surface, ce qui diminuerait sa flexibilité. Ainsi, la cellule ne serait pas en mesure de percevoir les propriétés élastiques d'Elactiv'. En effet, lorsque la protéine est ajoutée en solution dans le milieu de culture, sa flexibilité est augmentée, lui permettant d'adopter diverses conformations nécessaires à son activité biologique. Néanmoins, la présence de myofibroblastes observés en présence de la protéine Elactiv' est positive car les myofibroblastes sont notamment nécessaires dans le processus de cicatrisation des plaies, en particulier dans la phase de réparation, en conférant au tissu des propriétés contractiles qui facilitent la fermeture de la plaie (Grinnell 1982). Par ailleurs, l'absence d'augmentation du nombre de myofibroblastes en présence d'Elactiv' suggère que la différenciation myofibroblastique est contrôlée et qu'elle ne sera pas susceptible d'induire le développement de pathologies (Rnjak, Wise *et al.* 2011).

Dans le cadre de l'hydrogel Elactiv'-génipine, la protéine réticulée en 3D se trouve dans une situation intermédiaire entre l'extrême flexibilité rencontrée dans la phase liquide et la rigidité imposée lors de l'adsorption sur plastique. Cette flexibilité moyenne pourrait expliquer la biocompatibilité de l'hydrogel en présence des fibroblastes dermiques qui en surface s'étalent et prolifèrent de façon tout à fait satisfaisante sans différenciation myofibroblastique exacerbée.

III. Approche thérapeutique dans le syndrome de Williams-Beuren

III.1. Induction d'un dépôt fibrillaire de tropoélastine dans les cellules Williams-Beuren

Un des objectifs à visée thérapeutique d'Elactiv' est sans doute le remplacement de la TE là où elle manque. Après avoir démontré qu'Elactiv' était capable de renforcer *in vitro* les fibres de TE néo-synthétisées par des fibroblastes dermiques sains, l'effet de la protéine sur des fibroblastes pathologiques, qui ne synthétisent pas ou très peu de fibres élastiques *in vitro*, à savoir les fibroblastes dermiques de patients atteints du syndrome de Williams-Beuren (WB) a ensuite été évalué.

Lorsqu'Elactiv' est laissée au contact des fibroblastes WB pendant trois jours, de J5 à J8 post-confluence, aucune synthèse de dépôt fibrillaire de TE n'est induite. En revanche, de petits agrégats d'Elactiv', dont la formation nécessite l'activité de la LOX, sont visibles dans l'espace extracellulaire, ce qui signifie que le processus d'élastogenèse est engagé, et laisse supposer que ces agrégats pourraient se déposer sur les fibres de TE préformées au cours de plus longues périodes de culture.

La présence des agrégats réticulés d'Elactiv' indique que la LOX est présente dans l'espace extracellulaire et qu'elle a été synthétisée par les fibroblastes WB. Néanmoins, le non-dépôt des agrégats d'Elactiv' sur les quelques fibres de TE néo-synthétisées par les cellules WB, peut s'expliquer par la diminution de matériel élastique, due à la perte d'un allèle du gène de l'élastine (*ELN*) (Schubert 2009). Cette diminution peut entraîner une baisse de la synthèse des protéines associées aux microfibrilles, dont leur rôle est indispensable lors du dépôt des agrégats sur les microfibrilles et, par conséquent, dans la formation des fibres élastiques matures. Cette hypothèse permet d'expliquer la présence unique des agrégats réticulés d'Elactiv' dans l'espace extracellulaire. De plus, Elactiv' est ajoutée dans le milieu de culture des fibroblastes WB cinq jours post-confluence. Or c'est durant les cinq premiers jours de culture post-confluence que les cellules WB synthétisent et sécrètent les protéines matricielles, en particulier les protéines microfibrillaires. La diminution de la quantité de TE sécrétée par les cellules WB serait susceptible d'entraîner la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle négative inhibant la synthèse des protéines microfibrillaires.

Ainsi, à J5 post-confluence, lorsqu'Elactiv' est ajoutée dans le milieu de culture des cellules WB, une faible expression des protéines microfibrillaires et un temps d'incubation d'Elactiv' court (trois jours) ne serait pas suffisant pour inverser la tendance.

C'est la raison pour laquelle, dans une seconde expérience, Elactiv' a été ajoutée dans le milieu de culture de fibroblastes WB arrivés à confluence (J0). Le temps de contact entre Elactiv' et les cellules WB a été prolongé à 17 jours, pour que le système ait le temps de se stabiliser. Pendant ces 17 jours de culture, Elactiv' n'a été ajoutée qu'une seule fois dans le milieu, au début de l'expérience (J0), afin d'éviter l'induction d'une boucle de rétrocontrôle négative. Ces différentes modifications ont permis l'induction de la synthèse d'un dépôt fibrillaire de TE dans lequel Elactiv' est partiellement incorporée. L'absence d'agrégats réticulés d'Elactiv' dans l'espace extracellulaire, peut être la conséquence d'une prise en charge des agrégats par les fibres de TE néo-synthétisées, et/ou d'une dégradation des agrégats par les cellules WB par l'intermédiaire des MMP. La susceptible incorporation partielle d'Elactiv' au sein des dépôts fibrillaires de TE semble confirmer la première hypothèse. La seconde hypothèse envisagée implique que la présence d'Elactiv' dans l'espace extracellulaire, au moment de la synthèse de la TE, induit une boucle de rétrocontrôle positive, conduisant à l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion de TE par les cellules WB. La quantité de tropoélastine étant suffisante dans l'espace extracellulaire, Elactiv' ne serait plus nécessaire et les cellules WB déclencheraient la synthèse et la sécrétion de MMP, en particulier la MMP-2 connue pour dégrader Elactiv'.

C'est pourquoi, il aurait été intéressant de suivre l'expression de la MMP-2 tout au long de ces 17 jours de culture. Par ailleurs, il est important de souligner que les fibroblastes sains traités avec Elactiv' ne semblent pas induire une augmentation de la synthèse de dépôts fibrillaires de TE, même si une quantification précise n'a pas pu être réalisée.

En conclusion, l'induction d'un dépôt fibrillaire de TE par les cellules WB traitées avec la protéine Elactiv', souligne le potentiel thérapeutique d'Elactiv' dans ce syndrome. Elactiv' serait ainsi susceptible d'induire, renforcer ou réparer les fibres élastiques dans d'autres syndromes d'élastogenèse imparfaite caractérisés par une mutation sur le gène *ELN* (sténose supra-avalvulaire aortique SVAS, cutis laxa autosomique dominante de classe 1 CLAD1), mais également dans les tissus sains adultes présentant une altération des fibres élastiques (vieillesse et cicatrisation). Elactiv' serait d'autant plus efficace dans le syndrome CLAD1, où la plupart des patients portent des mutations dans le cadre de lecture à proximité de l'extrémité 3' du gène *ELN*, conduisant à une mutation faux-sens dans l'exon 36.

La TE mutée au niveau du domaine 36 ne se lie pas correctement à la fibrilline-1, ce qui diminue son dépôt sur les microfibrilles (Callewaert, Renard *et al.* 2011). Elactiv', par la présence du domaine 36 à son extrémité C-terminale, serait un candidat potentiel pour contrer ce défaut d'interaction avec la fibrilline-1 dans le syndrome CLAD1, contribuant au dépôt d'Elactiv' sur les microfibrilles et à la formation de fibres élastiques fonctionnelles.

Dans la littérature, dans le cas de pathologies vasculaires, les peptides élastiques sont utilisés en ingénierie tissulaire et non en tant qu'agent thérapeutique. De plus, ces peptides sont le plus souvent associés à des peptides de signalisation cellulaire (Di Zio and Tirrell 2003), des facteurs de croissance (Cai, Dinh *et al.* 2014) ou à des séquences bioactives (de Torre, Wolf *et al.* 2015) afin de leur assurer une activité biologique optimale. Contrairement à ces peptides élastiques chimériques, la structure primaire d'Elactiv' est beaucoup moins complexe car la protéine est formée uniquement de motifs présents dans la TE. Cette volonté de simplifier et de préserver la structure unique de la protéine native, confère à Elactiv' un fort potentiel biomimétique encore jamais démontré pour d'autres peptides élastiques synthétiques, lui permettant d'être utilisée en tant qu'agent thérapeutique dans le syndrome de Williams-Beuren ou dans d'autres modèles d'élastogénèses imparfaites.

III.2. Profil d'expression génique des cellules Williams-Beuren traitées avec Elactiv'

Afin de déterminer si la néo-synthèse de matériel élastique par les cellules WB traitées avec Elactiv' pouvait être la conséquence d'une induction génique, l'expression des gènes codant pour les protéines qui participent à l'assemblage des fibres élastiques a été suivie 24h et 48h après la confluence des cellules WB, temps nécessaire au dépôt de TE et à l'assemblage des fibres élastiques (Kozel, Ciliberto *et al.* 2004). De plus, pour savoir si l'assemblage d'Elactiv', au sein des dépôts fibrillaires de TE et sous forme de petits agrégats réticulés, nécessite un contact cellulaire via l'EBP, ce dernier a été inhibé en utilisant le L-lactose. L'hexapeptide VGVAPG a été utilisé en tant que contrôle positif.

Aucune variation significative de l'expression des gènes n'a été décelée. Il semblerait que la présence d'Elactiv' dans l'espace extracellulaire empêche donc uniquement l'induction d'une boucle de rétrocontrôle négative, diminuant la synthèse des protéines microfibrillaires suite à une réduction de la synthèse de tropoélastine, susceptible de se produire dans les cellules WB non traitées.

Toutefois, une tendance à l'augmentation de l'expression des gènes de la fibuline-5 (*FBLN5*) et de la fibrilline-1 (*FBNI*) est observée après 48h de culture en présence d'Elactiv', et cet effet est contrecarré par le L-lactose.

Ce phénomène n'a pas été observé en présence du peptide VGVAPG. Ceci est probablement dû à la structure plus complexe d'Elactiv', qui présente de fortes homologues de séquences avec la TE. La fibuline-5 et la fibrilline-1 interviennent dans les premières étapes de l'assemblage des fibres élastiques en empêchant la croissance des coacervats au-delà de la taille observée *in vivo*, et favorisent leur regroupement en un réseau organisé (Cirulis, Bellingham *et al.* 2008), permettant *in fine* leur dépôt sur les microfibrilles. Etant donné la taille plus importante des agrégats réticulés d'Elactiv', il est possible que l'expression des gènes *FBLN5* et *FBNI* soit augmentée dans le but de limiter la croissance des agrégats afin de permettre leur dépôt sur le réseau microfibrillaire. De plus, la diminution de l'expression de la *FBLN5* et de la *FBNI* en présence du L-lactose (inhibiteur de l'EBP) signifie que la réorganisation des agrégats d'Elactiv' par la fibuline-5 et la fibrilline-1 a lieu à la surface de la cellule, plus précisément sur l'EBP. Les molécules d'Elactiv' entreraient en contact avec la cellule par l'intermédiaire de l'EBP, grâce notamment à leurs motifs VGVAPG, afin d'être réorganisées et prises en charge par les protéines microfibrillaires.

L'expression du gène de la MMP-1 a également été évaluée pour déterminer si la présence d'Elactiv' entraîne une augmentation de son expression, observée en présence du peptide synthétique VGVAPG mais également en présence des peptides hétérogènes (α - et κ -élastine), obtenus par hydrolyse chimique de l'élastine insoluble dans des cultures de fibroblastes sains (Brassart, Fuchs *et al.* 2001). L'augmentation de l'expression de la MMP-1 est susceptible de déclencher des réactions inflammatoires et, il a récemment été démontré que la κ -élastine est impliquée *in vivo* dans la croissance et l'invasion du mélanome par la surexpression et l'activation de la MMP-1 (Devy, Duca *et al.* 2010). Dans nos conditions de culture, où les cellules WB ont été traitées avec Elactiv', l'expression du gène *MMP1* est diminuée dès T24h par rapport à la condition non traitée ; la protéine Elactiv' n'est donc pas susceptible de déclencher des réactions inflammatoires par la voie de la MMP-1. En revanche, cette diminution est également observée en présence du peptide VGVAPG, venant contredire les données présentes dans la littérature.

IV. Approche en ingénierie tissulaire

Ce travail de thèse s'est inscrit dans le projet ANR DHERMIC qui avait objectif de développer un biomatériau hybride (ou composite) mimant l'environnement biomécanique extracellulaire natif de la peau afin d'améliorer sa régénération *in vivo* et sa modélisation *in vitro*. L'architecture plus complexe de ce type de biomatériau permet d'augmenter leurs propriétés mécaniques et leurs fonctions biologiques, ce qui s'est révélé être un facteur limitant dans l'hydrogel Elactiv'. Plusieurs exemples dans la littérature associent les ELP à des peptides (peptides dérivés de la soie), des protéines (collagène, fibronectine), des polysaccharides ou encore des polymères synthétiques (polyéthylène glycol, polyuréthane) ou naturels (chitosan), utilisés dans la fabrication de nanoparticules, hydrogels, films, tubes ou nanofibres (Yeo, Aghaei-Ghareh-Bolagh *et al.* 2015). Ces matériaux présentent des propriétés correspondant généralement à la somme pondérée des propriétés des partenaires associés.

Pour le développement de notre biomatériau hybride, nous avons choisi d'associer la protéine Elactiv' à un polymère synthétique conçu par COLCOM, le dendrigraft de poly(L-lysine) en raison de sa biocompatibilité, sa stabilité, sa reproductibilité, sa flexibilité et son faible coût de fabrication. En effet, du fait de l'utilisation de l'eau comme solvant, la synthèse des DGL est dite « verte » et leur biodégradation ne libère que de la lysine, acide aminé essentiel. De plus, la standardisation des procédés de synthèse permet d'obtenir des DGL de tailles parfaitement identiques pour chaque nouveau lot. Enfin, leur plus grande flexibilité par rapport aux dendrimères classiques permet aux DGL d'épouser un plus grand nombre de récepteurs biologiques que ces derniers pour une même taille.

IV.1. Les dendrigrafts de poly(L-lysine) : DGL

Les DGL et la PLL (utilisée comme substrat de référence en culture cellulaire), présentent des profils similaires de cytotoxicité. Aux faibles concentrations (en dessous de 10 µg/ml), les DGL et la PLL induisent une augmentation de la viabilité des fibroblastes dermiques d'environ 25% en comparaison avec les cellules non traitées. L'effet direct des solutions de PLL, à faibles concentrations, sur la prolifération des fibroblastes est faiblement documenté ; cependant, un effet positif à 1 µg/ml sur l'adhésion et la prolifération des cellules souches mésenchymateuses humaines, a été rapporté (Lu, Guo *et al.* 2009).

La prolifération des fibroblastes dermiques humains, sur des surfaces fonctionnalisées avec les DGL, est augmentée dès deux jours après l'ensemencement des cellules et représente, après quatre jours, un gain de 33% de l'activité métabolique mesurée comparé au contrôle. Ces données sont cohérentes avec celles obtenues sur des surfaces recouvertes de PLL (Lu, Guo *et al.* 2009); néanmoins, le mécanisme qui conduit à une telle augmentation est inconnu. Récemment, les PLL et DGL-G4 ont été utilisés pour augmenter l'adsorption des peptides de la mélanocortine afin de former des films multicouches sur des surfaces en verre pour la culture de fibroblastes de la pulpe dentaire (Fioretti, Mendoza-Palomares *et al.* 2010). La même stratégie a ensuite été utilisée avec les DGL-G5 pour piéger les BMP2 (*Bone Morphogenic Protein 2*) dans des nanoréservoirs avec une libération contrôlée dans le cadre de la régénération osseuse (Mendoza-Palomares, Ferrand *et al.* 2012). Ceci implique que les DGL peuvent piéger passivement des facteurs de croissance. Dans nos conditions, l'augmentation de la prolifération des fibroblastes dermiques peut s'expliquer par l'interaction entre les DGL et les facteurs de croissance contenus dans le sérum de veau fœtal, et sont ainsi concentrés localement et plus disponibles pour les cellules. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de Lu *et al.* qui révèlent qu'aucune augmentation de la prolifération n'est observée en présence de la PLL quand les cellules sont cultivées dans un milieu sans sérum (Lu, Guo *et al.* 2009).

L'adhérence des fibroblastes dermiques humains est augmentée de 20 % en présence des DGL G2-G4 par rapport à la PLL. L'adhérence des cellules sur des substrats de polylysine est considérée comme un phénomène rapide et passif, et interprété comme une interaction entre les membranes plasmiques des cellules polyanioniques et la couche polycationique apportée par les groupes amino de la polylysine (Mazia, Schatten *et al.* 1975). Les surfaces des PLL offrent une plus faible densité de groupes amino par nm^2 que les DGL (Coussot, Faye *et al.* 2011). Les DGL seraient donc plus enclins à attirer les cellules par des forces électrostatiques dans la phase initiale de l'adhésion.

L'augmentation de l'adhésion des fibroblastes dermiques humains sur les DGL a été confirmée par l'observation de l'étalement des cellules qui commence dès 30 min sur les DGL et la PLL comparé au contrôle. Il existe deux modes d'étalement cellulaire : un mode isotropique et un mode anisotropique (Dubin-Thaler, Giannone *et al.* 2004). L'étalement isotropique est une phase rapide caractérisée par un segment continu du bord de la cellule donnant une forme ronde.

Ce mode d'étalement est favorisé par la privation du sérum dans le milieu de culture utilisé. Dublin-Thaler *et al.* ont observé une transition vers un étalement anisotropique pour de plus longues incubations. L'étalement anisotropique est caractérisé par un ralentissement de la croissance. De plus, de très petites saillies à partir de la membrane cellulaire, appelées filopodes, et une rétractation des bords membranaires sont observées après 30 minutes d'incubation des fibroblastes dermiques humains sur les différents supports. Après 60 minutes d'incubation, la plupart des cellules présente une morphologie d'étalement anisotropique sur des surfaces recouvertes de DGL alors que ce phénomène est particulièrement retardé sur le contrôle.

Par ailleurs, la sous-unité α_5 de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est légèrement surexprimée dans les cellules cultivées sur des surfaces de DGL G2-G4, tandis qu'une expression basale identique est observée dans les cellules cultivées sur le contrôle et la PLL. En revanche, aucune variation de l'expression de la sous-unité β_1 n'est observée dans ces conditions. Néanmoins, la sous-unité β_1 est capable de se lier à douze sous-unités α différentes (Hynes 2002), et est synthétisée en excès par rapport aux sous-unités α dans les fibroblastes (Heino, Ignatz *et al.* 1989). Ainsi, la plus grande quantité de sous-unités α_5 détectée dans les cultures de fibroblastes en présence des DGL suggère une augmentation de la formation du complexe intégrine $\alpha_5\beta_1$ à la surface de la cellule. De plus, l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est capable de reconnaître une séquence consensus RGD contenue dans la fibronectine. Récemment, la structure à l'échelle atomique de l'ectodomaine de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ a permis de mieux comprendre l'interaction avec le peptide RGD (Nagae, Re *et al.* 2012). C'est au niveau de ce site que se fixe le motif RGD du ligand par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogènes entre l'arginine et la poche de l'intégrine. De plus, le peptide RGD se fixe à l'intégrine sans induire de changements conformationnels sur l'intégrine non-activée. Il serait tentant d'émettre l'hypothèse que les DGL puissent servir de ligand pour cette intégrine de par leur structure tridimensionnelle, leur souplesse ainsi que leur haute densité de fonctions $-\text{NH}_3^+$ en surface. Peu d'exemples dans la littérature font état de l'induction de voies de signalisation, via les intégrines, des cellules cultivées sur des supports synthétiques. Des nanocomposites polyuréthane-or ont récemment été présentés pour activer l'intégrine $\alpha_5\beta$ dans les cellules endothéliales et dans une moindre mesure dans les fibroblastes (Hung, Chu *et al.* 2012). En réponse à cette activation, une augmentation de l'expression de la MMP-2 a été observée. L'activation de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est un mécanisme prépondérant de l'adhésion des fibroblastes dermiques et des expériences ont été conduites sur des polymères de type polyamidoamine

(PAMAM) à la surface desquels des peptides RGD ont été liés de façon covalente pour optimiser l'adhésion cellulaire sur les biomatériaux (Yang and Kao 2007). Les DGL présenteraient donc un intérêt majeur s'ils pouvaient mimer la présence de fibronectine sans même être fonctionnalisés.

Les niveaux d'activité et d'expression de la MMP-2 restent inchangés après deux jours de culture des fibroblastes dermiques sur les DGL G2-G4. Dans les cultures bidimensionnelles, les cellules n'ont pas besoin de surexprimer la MMP-2 pour envahir la MEC préformée. Ainsi, l'expression stable de la MMP-2 serait considérée comme un bon indicateur.

IV.2 Hydrogel composite Elactiv'-DGL

Après avoir caractérisé les DGL comme support de culture 2D pour les fibroblastes dermiques, nous avons développé un hydrogel composite Elactiv'-DGL grâce à la réticulation des fonctions amines des résidus lysyl- des DGL-G3 et de la protéine Elactiv', par l'intermédiaire d'un bras de réticulation, le NHS-PEG-NHS. Ainsi, les DGL, Elactiv' et le NHS-PEG-NHS permettent grâce à leur propriétés hydrophile, élastique et réticulante, de modéliser respectivement les protéoglycanes, l'élastine et le collagène, acteurs majeurs de la MEC.

Pour faciliter la colonisation cellulaire, la néo-vascularisation et la néo-synthèse de tissu, l'hydrogel composite a été rendu poreux par une approche classique de porogène à base de microsphères de paraffine, permettant la formation de pores hétérogènes de taille comprise entre 50 et 100 μm .

Les résultats préliminaires obtenus révèlent que l'hydrogel composite Elactiv'-DGL présente un comportement mécanique caractéristique d'un matériau élastique avec une faible viscosité. Le module complexe d'Young de l'hydrogel (120 kPa) est légèrement supérieur à celui du derme *in vivo* (entre 2 et 80 kPa en fonction de l'âge) (Pailler-Mattei, Bec *et al.* 2008). Des hydrogels hybrides, développés pour l'ingénierie tissulaire cutanée et constitués d'élastine et d'un copolymère synthétique le PNPHO (*poly(N-isopropylacrylamide-co-poly(lactide-2-hydroxyethyl methacrylate-co-oligo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate)*), présentent un module d'Young qui varie de 40 à 145 kPa en fonction de la composition du copolymère (Fathi, Mithieux *et al.* 2014).

De même, des matrices 3D de collagène et de TE recombinante, développées pour l'ingénierie tissulaire du derme, présentent un module d'Young qui varie entre 160 et 800 kPa en fonction du ratio TE : collagène (Rnjak-Kovacina, Wise *et al.* 2012).

Par ailleurs, il a été démontrée que l'hydrogel Elactiv'-DGL présente une biocompatibilité satisfaisante *in vitro*, en présence des fibroblastes dermiques, mais également *in vivo* avec une invasion des cellules inflammatoires et des fibroblastes permettant la néo-synthèse de MEC.

La réaction inflammatoire générée chez les souris suite à l'implantation en sous-cutanée de l'hydrogel Elactiv'-DGL, est une réaction qui se produit systématiquement suite à l'apparition d'un corps étranger dans le tissu cutané. Une réaction quasi-similaire a été observée pour des matrices 3D composées de nanofibres de collagène et de TE recombinante, implantées en sous-cutanée pendant 6 semaines chez la souris (Rnjak-Kovacina, Wise *et al.* 2012).

La pénétration des cellules inflammatoires, telles que les macrophages, est notamment indispensable dans le processus de cicatrisation des plaies car ces cellules sécrètent des facteurs de croissance qui dictent le recrutement des cellules essentielles à la réparation, à savoir les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules endothéliales (Krafts 2010). De plus, nous avons pu observer que les macrophages dégradent de façon significative l'hydrogel Elactiv'-DGL, ce qui favorise la migration et la prolifération cellulaire et pourrait, dans le cas d'une plaie, accélérer le processus de guérison. Par ailleurs, une néo-vascularisation importante a également pu être observée au niveau des pores de l'hydrogel. Ces vaisseaux nouvellement formés assurent la nutrition et l'oxygénation des cellules permettant à terme la formation d'un derme équivalent. De plus, la néo-vascularisation est un facteur déterminant dans la cicatrisation d'une plaie, notamment à la suite d'une brûlure (Tredget 2007). En effet, la réparation de la vascularisation cutanée détermine en grande partie si une brûlure du second degré peut guérir rapidement ou si, en raison du retard de cicatrisation, elle devient une brûlure du troisième degré. Ainsi, la néo-vascularisation peut favoriser la régénération de la couche dermique et la formation complète de la peau. Lors de graves brûlures (deuxième degré ou plus), les substituts cutanés sont alors indispensables pour permettre la cicatrisation du patient. Aujourd'hui, les substituts cutanés autorisés en France (EzDerm, Matriderm et Integra) (Dantzer 2011) (Troy, Karlinski *et al.* 2013), qui tentent au mieux de mimer la complexité de la peau, sont d'origine allogénique ou xénogénique. La plupart d'entre eux adhèrent mal à la zone lésée. De plus, le collagène, la biomacromolécule la plus utilisée dans ces substituts cutanés, a montré une néo-angiogénèse insuffisante des tissus. Au cours de ces dix dernières années, de nombreux hydrogels délivrant des facteurs de croissance (Puolakkainen, Twardzik *et al.* 1995), des cytokines (Kiyozumi, Kanatani *et al.* 2006) et des

antibiotiques (Shepherd, Sarker *et al.* 2011) ont été développés dans le but d'induire une néo-vascularisation permettant la régénération complète de la peau. Ainsi, notre hydrogel composite Elactiv'-DGL seul, sans l'ajout de molécules bioactives, est susceptible de permettre et supporter une néo-vascularisation. Les résultats préliminaires obtenus soulignent le potentiel de l'hydrogel Elactiv'-DGL dans le développement d'un substitut cutané pour la médecine régénérative.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

I. Conclusion

Dans ce travail de thèse, nous avons développé, caractérisé et évalué les potentiels thérapeutiques d'une protéine élastique, inspirée de la structure unique de la TE.

Sa structure primaire, en étroite corrélation avec celle de la TE, permet à Elactiv' de conserver les caractéristiques physico-chimiques (pHi très basique, repliement en hélice gauche de type PPII, comportement thermosensible, capacité intrinsèque de coacervation, propriétés d'auto-assemblage) et les fonctions biologiques de la protéine native (prolifération, différenciation et survie des fibroblastes dermiques et kératinocytes humains, sensibilité à la dégradation par les MMP-2 et -12). De plus, Elactiv' possède la particularité *in vitro* de s'incorporer dans les fibres élastiques néo-synthétisées par les fibroblastes dermiques sains. Ces caractéristiques font d'Elactiv' une protéine élastique à fort potentiel biomimétique. D'autre part, un hydrogel formé exclusivement d'Elactiv' a permis d'accéder aux propriétés mécaniques de l'ensemble et de vérifier sa biocompatibilité *in vitro* et son innocuité et sa résorption *in vivo*.

Outre son potentiel biomimétique, Elactiv' présente également un potentiel thérapeutique comme il a pu être démontré *in vitro* dans le syndrome de Williams-Beuren (WB). Les fibroblastes dermiques de ces patients traités avec Elactiv' ont pu synthétiser un dépôt fibrillaire de tropoélastine, ce qu'ils ne sont pas capables de faire en l'absence du traitement. Cette néo-synthèse de matériel élastique s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes des fibuline-5 et fibrilline-1, protéines microfibrillaires qui participent à l'assemblage des fibres élastiques.

En plus de son application comme agent thérapeutique, nous avons pu démontrer que la protéine Elactiv', associée à un polymère synthétique le dendrigraft de poly(L-lysine) et à un bras de réticulation (le polyéthylène glycol), est capable de former un hydrogel hybride bio-élasto-mimétique. Cet hydrogel modélise les acteurs principaux de la MEC à savoir le collagène, les protéoglycanes (PG) et l'élastine. En effet, le bras de réticulation permet la formation d'un maillage avec les DGL et Elactiv', constituant de ce fait l'architecture de l'hydrogel, et rappelle le rôle de soutien des fibres de collagène ; les DGL miment les PG en intervenant dans la viscosité de l'hydrogel par leurs propriétés hydrophiles et réticulantes ; alors qu'Elactiv' apporte l'élasticité au matériau.

Les premières analyses mécaniques indiquent que l'hydrogel hybride présente un comportement viscoélastique avec un module d'Young du même ordre de grandeur que ceux des hydrogels développés pour l'ingénierie tissulaire cutanée. De plus, sa biocompatibilité, sa biodégradabilité ainsi que ses propriétés pro-angiogéniques observées *in vivo* en font un candidat prometteur pour la régénération de la peau et probablement pour la régénération des tissus mous en général.

II. Perspectives

Ce travail de thèse sur le développement, la caractérisation et l'évaluation des potentiels thérapeutiques de la protéine Elactiv a permis d'envisager des perspectives aussi bien appliquées que fondamentales.

Une première importante question ambitionne d'établir la preuve de concept manquante entre la protéine Elactiv' et son application dans la réparation des tissus mous avec comme première cible l'artériopathie associée au syndrome de WB. Les principales complications vasculaires du syndrome WB, imputables au déficit en élastine, sont la rigidification des parois artérielles aboutissant à l'hypertension, et les sténoses artérielles dues à une hyperprolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), normalement contenue par l'élastine au sein de la paroi aortique (Urban, Zhang *et al.* 2001; Urban, Riazi *et al.* 2002). Ainsi, Elactiv' se présente comme un candidat thérapeutique potentiel pour stimuler la synthèse et renforcer l'assemblage des fibres élastiques dans les artères WB. Pour cela, il conviendrait de mieux comprendre le mécanisme d'intégration d'Elactiv' au sein des fibres élastiques ; mais aussi de définir des biomarqueurs cellulaires (épigénétiques) pour savoir si la reconstruction élastique induite ou renforcée par Elactiv' permet en retour de recouvrer un phénotype cellulaire sain. Ce travail est envisageable *in vitro* à partir de cellules issues de biopsies cutanées de patients. Dans une deuxième partie, il s'agirait d'évaluer le potentiel pro-élastogénique artériel d'Elactiv' *in vivo* à travers des modèles biologiques plus intégrés (souris, zébrafish). L'effet de la protéine Elactiv' serait notamment évalué sur la physiologie vasculaire des souris hémizygotes *Eln* +/- développées dans le laboratoire Hypoxie Physiopathologie de Gilles Faury (Grenoble). Ces souris présentent des caractéristiques sévères des patients WB au niveau cardiovasculaire.

Outre l'apport de données sur la compréhension des mécanismes du syndrome initial, les résultats de cette étude permettraient d'envisager des tests précliniques pour une nouvelle thérapie appliquée à cette maladie rare, et d'offrir une solution pharmacologique à un grand nombre de maladies cardio-vasculaires en général.

Un autre axe applicatif de mon travail de thèse pourrait se baser sur les propriétés biologiques de l'hydrogel hybride, initialement développé pour les tissus mous, dans d'autres domaines de l'ingénierie tissulaire telle que la reconstruction osseuse. Par exemple, en mélangeant l'hydrogel à un ciment phosphocalcique (matériau biocompatible couramment utilisé pour la régénération osseuse) pour former un hydrogel présentant des propriétés élastiques modulables et proches du périoste. La réticulation de la phase liquide en hydrogel bio-élasto-mimétique peut être modulée par le ratio des différents composants, la température ainsi que le pH, grâce notamment au caractère thermo-sensible d'Elactiv', pour atteindre des temps de formation de quelques dizaines de minutes. De plus, la biocompatibilité et la résorption de l'hydrogel Elactiv'-DGL, ainsi que ses propriétés pro-angiogéniques observées *in vivo* en font un candidat original et pertinent pour être couplé à une matrice phosphocalcique ostéogénique.

Outre ces perspectives très appliquées sur le potentiel thérapeutique d'Elactiv' dans la réparation des tissus mous, et sur les propriétés biologiques de l'hydrogel hybride dans la reconstruction osseuse, des perspectives plus fondamentales peuvent être envisagées concernant l'influence des propriétés biomécaniques de l'hydrogel hybride bio-élasto-mimétique sur la régulation de l'expression génique, en particulier des marques épigénétiques.

Le microenvironnement cellulaire joue un rôle fondamental dans l'homéostasie et le développement des tissus. Au sein des tissus, les interactions cellules/MEC sont importantes pour de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la survie et la morphologie. Alors que les facteurs biochimiques responsables de ces mécanismes sont largement étudiés, peu de données existent sur l'implication des propriétés biomécaniques du microenvironnement, et plus précisément sur les mécanismes moléculaires par lesquels les forces mécaniques peuvent agir à distance pour induire la transduction de signaux biochimiques dans le noyau et ainsi réguler l'expression génique (**Figure 91**) (Wang, Tytell *et al.* 2009). Ce processus est connu sous le nom de mécanotransduction.

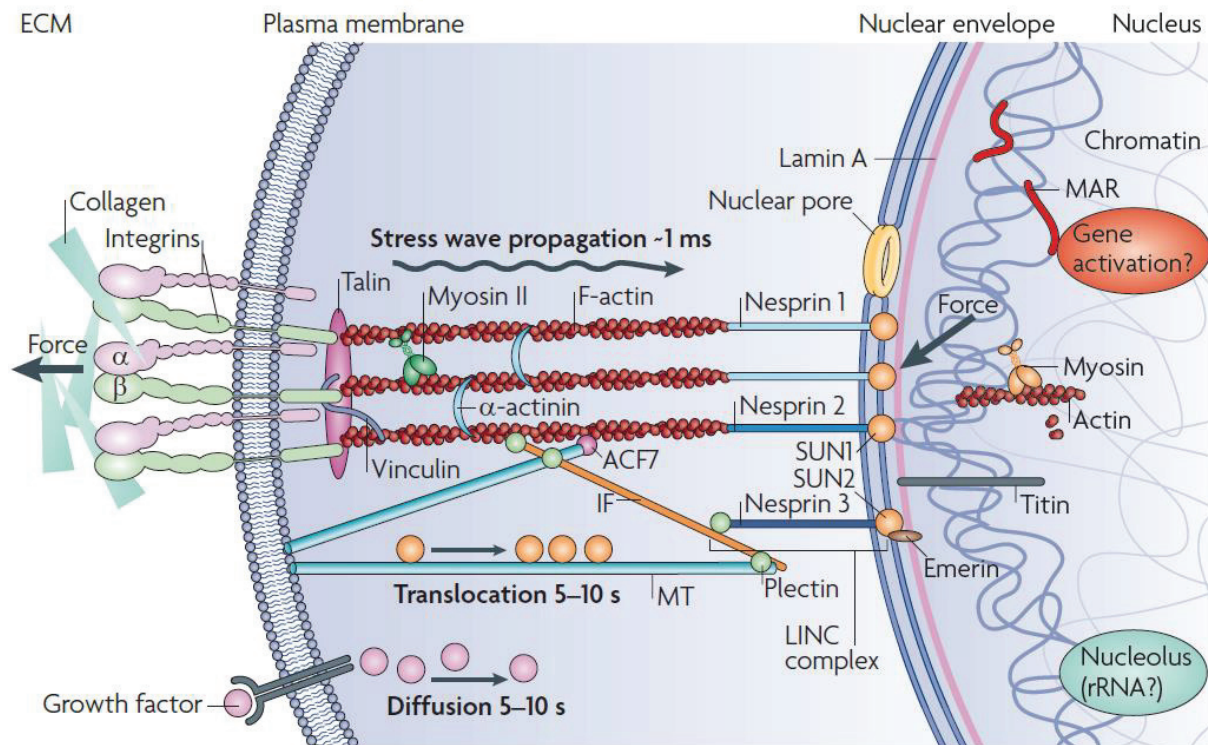


Figure 91: Connectivité moléculaire de la matrice extracellulaire au noyau. Mécanismes moléculaires par lesquels les forces mécaniques peuvent agir à distance pour induire la transduction de signaux biochimiques dans le noyau et ainsi réguler l'expression génique (Wang, Tytell *et al.* 2009).

Les cellules sentent les propriétés mécaniques de leur microenvironnement et génèrent des forces plus ou moins intenses en fonction de la rigidité de la MEC. Les forces générées sont transmises aux récepteurs transmembranaires des cellules, tels que les intégrines et les cadhérines, qui se regroupent et forment des plaques focales d'adhésion matures à partir desquelles se fixent le cytosquelette d'actine.

Dans le cas de l'hydrogel hybride Elactiv' / DGL-G3, il serait intéressant d'analyser la morphologie des fibroblastes dermiques humains ensemencés à la surface d'hydrogels plus ou moins rigides, en faisant varier leur module d'Young grâce au ratio Elactiv' : NHS-PEG-NHS : DGL-G3. Pour cela, il conviendrait d'immunomarquer le cytosquelette et plus précisément les microfilaments d'actine (actine-F, actine- α), les microtubules (tubuline) et les filaments intermédiaires (en marquant notamment les filaments de vimentine qui jouent un rôle important dans le maintien de la morphologie cellulaire et dans l'intégrité du cytoplasme grâce à leur connexion avec le noyau de la cellule). Il conviendrait également d'analyser l'expression des protéines qui constituent les plaques focales d'adhésion (Vinculine, Taline, Paxilline) par immunomarquage et western-blot.

Enfin, il serait intéressant d'analyser les propriétés mécaniques des cellules par AFM ou magnétocytométrie car en fonction de la rigidité du support, les forces exercées par les cellules sont plus ou moins importantes.

Les microfilaments d'actine étant directement connectés au noyau de la cellule, leur réorganisation génère des forces sur la membrane nucléaire susceptibles de modifier l'expression des gènes. La surface interne de l'enveloppe nucléaire est unie à un maillage fibrillaire dense appelé la lamina nucléaire. Les lamines, protéines majeures de la lamina, jouent un rôle central dans le contrôle de l'organisation de la chromatine et dans la fonction des gènes. L'unité d'organisation de la structure chromatinienne, appelée nucléosome, se compose d'ADN associé à un octamère d'histones. Les histones sont capables de moduler l'état de compaction de la chromatine, notamment par des modifications post-traductionnelles au niveau de leur région N-terminale qui sont définies comme étant des marques épigénétiques (Laird 2005). Par exemple, l'acétylation des histones, par les histones acétyltransférases (HAT), favorise une chromatine relâchée et donc la transcription génique alors que la désacétylation des histones, par les histones désacétylases (HDAC), entraîne la compaction de la chromatine qui devient transcriptionnellement inactive. Un autre exemple de marque épigénétique est la méthylation des résidus lysyl- des histones, par des histones méthyltransférases (HMT), favorisant soit la transcription génique (méthylation du résidu lysyl- 4 de l'histone 3) ou la répression génique (méthylation du résidu lysyl- 9 de l'histone 3). La méthylation de l'ADN, au niveau des îlots CpG (régions riches en dinucléotides Cytosine-Guanosine (C-G) situés généralement à proximité du site d'initiation de la transcription), a également un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes (Miranda and Jones 2007). Il est admis que dans les régions codantes de l'hétérochromatine, la méthylation des cytosines en position 5, par des ADN méthyltransférases (DNMT), inhibe la transcription génique alors que leur déméthylation, par des ADN déméthylases, favorise la transcription (Laurent, Wong *et al.* 2010). La variabilité de ces marques épigénétiques est indispensable à l'intégrité de la cellule et indique que les propriétés biomécaniques du microenvironnement peuvent influencer la régulation de l'expression des gènes. Engler *et al* ont démontré que la rigidité du support, représenté par des gels de polyacrylamide recouverts de collagène type I, contrôle la différenciation des cellules souches hématopoïétiques aussi bien au niveau de leur forme que de leur profil d'expression génique (Engler, Sen *et al.* 2006). De plus, une autre étude a démontré que la structure du support influence la morphologie des cellules et entraîne une modification des histones (étirés ou relâchés) (Downing, Soto *et al.* 2013).

Par conséquent, en ingénierie tissulaire l'élasticité et la structure du biomatériau sont deux paramètres biophysiques qui influencent les régulateurs épigénétiques. Dans le cas de l'hydrogel hybride Elactiv'-DGL, il serait intéressant d'analyser ces marques épigénétiques notamment l'analyse de la méthylation de l'ADN. Cette question peut être abordée par une approche sans *a priori* visant à analyser le génome dans son entièreté par l'utilisation de puces dédiées (Infinium BeadChip). Cette approche globale permettrait de découvrir des gènes cibles potentiels dont la méthylation est modulée en réponse à l'environnement mécanique. Il est aussi envisageable de cibler des gènes précis dont on soupçonne d'être la cible de modulation en réponse à l'environnement mécanique par la technique d'HRM-PCR (*High Resolution Melting PCR*) mise au point dans notre laboratoire. Enfin, le lien mécanistique reliant toutes ces modulations devra être élucidé. A terme, ce travail fondamental permettrait d'apporter un nouveau regard sur les événements reliant le microenvironnement cellulaire mécanique et le devenir des cellules saines ou pathologiques.

COMMUNICATIONS

❖ Communications orales

➤ Nationale :

- XXIII^{ème} congrès annuel de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMEc) (mars 2015, Lyon, France) : **Development of an elastin-like recombinamer mimicking cell microenvironment.** Lorion C., Sommer P., Sohier J., Debret R.

➤ Internationale :

- Elastin Gordon Research Seminar (GRS) (Juillet 2015, Biddeford, Etats-Unis): **Development of an elastin-like recombinamer as a potential candidate for therapeutic approach in Williams-Beuren syndrome.** Lorion C., Sommer P., Sohier J., Debret R.

❖ Communications écrites (Posters)

➤ Nationales:

- Journée annuelle du Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR5305 (décembre 2013, Lyon, France) : **Development of a protein mimicking cell environment microelasticity.** Lorion C., Sommer P., Sohier J., Debret R.
- 18^{ème} journée scientifique de l'EDISS (octobre 2013, Lyon, France) : **Characterization of poly(L-lysine) dendrigrafts as biosynthetic substrates for tissue engineering.** Lorion C., Faye C., Maret B., Ramonda M., Trimaille T., Régnier T., Sohier J., Sommer P., Debret R.

XXI^{ème} congrès annuel de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMEc) (mars 2013, Strasbourg, France) : **Characterization of poly(L-lysine) dendrigrafts as biosynthetic substrates for tissue engineering.** Lorion C., Faye C., Maret B., Ramonda M., Trimaille T., Régnier T., Sohier J., Sommer P., Debret R.

➤ Internationale:

- Elastin Gordon Research Conference (GRC) (Juillet 2015, Biddeford, Etats-Unis): Development of an elastin-like recombinamer as a potential candidate for therapeutic approach in Williams-Beuren syndrome.
Lorion C., Sommer P., Sohier J., Debret R.

❖ Publications

- **Synthesis and characterization of an elastin-like protein mimicking cell environment microelasticity.** Lorion C., Pailler-Mattei C., Sommer P., Sohier J., Debret., R. (en attente d’être soumise pour cause de brevet).
- **Biosynthetic support based on dendritic poly(L-lysine) improves human skin fibroblasts attachment.** Lorion C., Faye C., Maret B., Trimaille T., Régnier T., Sommer P., Debret R. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 25(2): 136-149 (octobre 2013).

❖ Brevet

Projet d’innovation “GELASTIC” (en cours de rédaction).

ANNEXES

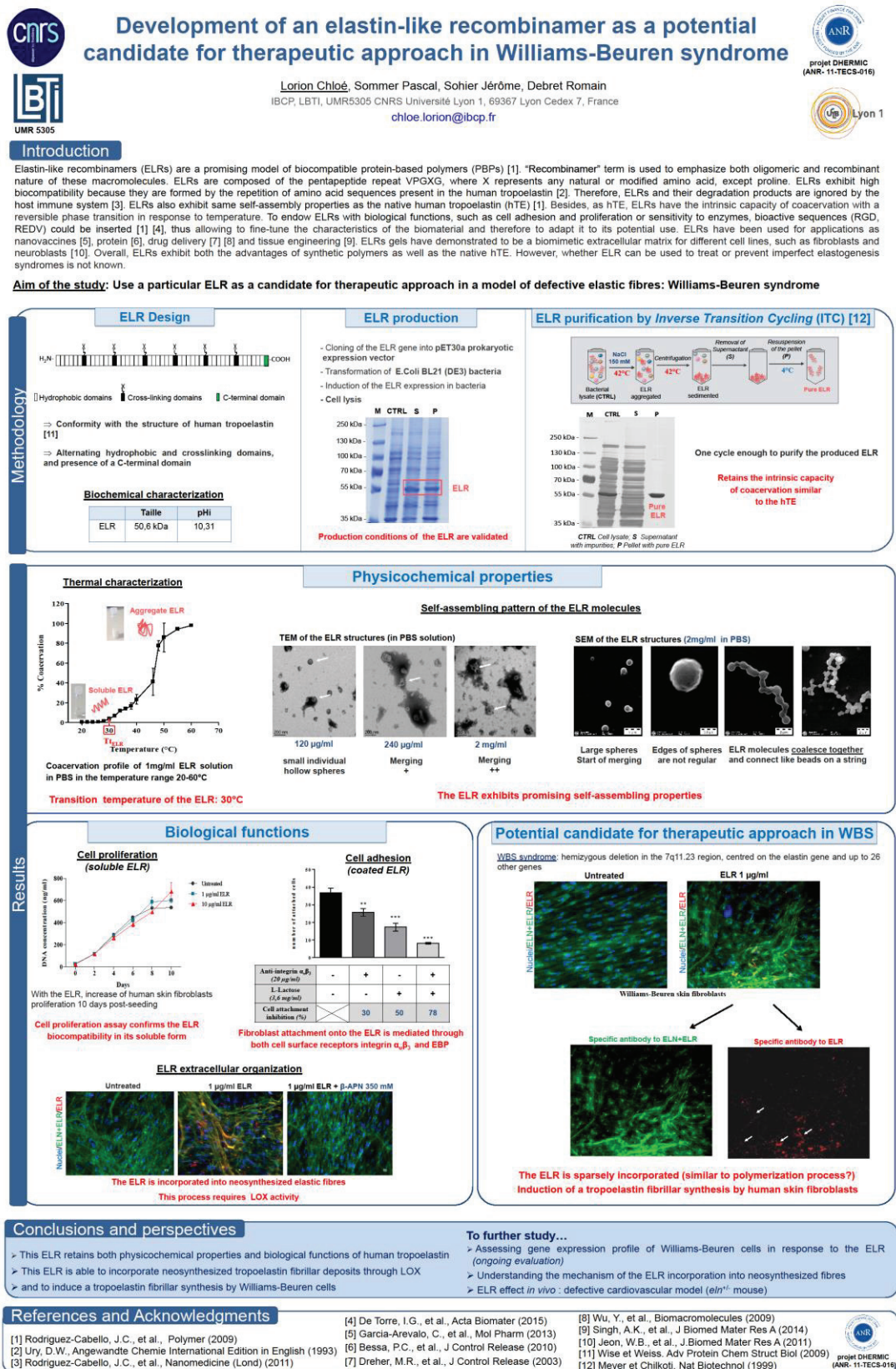
➤ Annexe 1 : Expériences pendant la thèse

- Encadrement pédagogique d'une étudiante en stage de master 1

“Etude d'une protéine élastique comme outil potentiel pour une approche thérapeutique dans le syndrome de Williams-Beuren” (Marlène Hanser, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB), Faculté de Pharmacie de Lyon, Master Siences du Médicament).

- Représentante des doctorants au conseil du laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI, UMR5305) : 2013-2015

➤ **Annexe 2:** Poster présenté à l'Elastin Gordon Research Conference (Juillet 2015, Biddeford, Etats-Unis).



- **Annexe 3** : Poster présenté à la journée annuelle du Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTI), UMR5305 (décembre 2013, Lyon, France).



Development of a protein mimicking cell environment microelasticity

Lorion Chloé, Sohier Jérôme, Sommer Pascal, Debreit Romain
IBCP, LBTI, UMR5305 CNRS Université Lyon 1, 69367 Lyon Cedex 7, France
chloe.lorion@ibcp.fr



Introduction

Extracellular matrix (ECM)/cell interaction is of critical importance for many cellular processes such as proliferation, differentiation, survival and morphology. At a larger scale, the cell microenvironment plays a fundamental role in tissue development, homeostasis or wound healing. While ECM biochemical factors responsible for such mechanisms are widely studied, little is known about the involvement of the microenvironment biomechanical properties.

Each tissue is characterized by a specific mechanical behaviour that can be partly represented by the value of an elastic modulus E (in Pa) determined by physical approaches. In this way, the biological tissue can be ranked from the softer (low E , brain) to the stiffer (high E , bone). So far, elastic properties of soft tissues have been seldom considered in tissue engineering models mainly represented by collagen-based scaffolds that do not scale with native elastic modulus and result in extensive cell contraction.

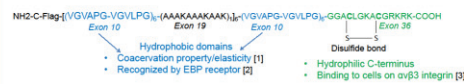
Accordingly, the aim of our study is to provide an elastic biomaterial inspired by native soft tissue, able to induce an increase of elasticity during skin wound healing, and more generally optimize soft tissue repair.

First step of the study: Mimicking cell environment microelasticity using a chimeric protein inspired by the unique structure of human tropoelastin

Methodology

Elastic protein design

Elastic protein primary structure

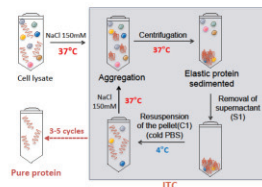


Conformity with the unique structure of human tropoelastin

⇒ Alternating hydrophobic and crosslinking domains: highly conserved between different species [4]

Biochemicals characterization	Taille	pH
Tropoelastin	72 kDa	10.4
Elastic protein	50.6 kDa	10.31

Elastic protein purification by Inverse Transition Cycling (ITC)



Purification method:
Inverse Transition Cycling (ITC) [5]

Results

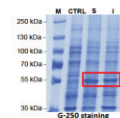
Elastic protein synthesis

Cloning

- Optimization of gene sequence encoding for elastic protein
- Prokaryotic expression system (bacteria)
- Outsourcing gene synthesis by GenScript company
- Cloning of gene into pET30a prokaryotic expression vector

Production

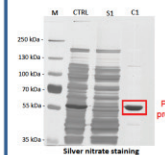
- Transformation of E. coli BL21 DE3 bacteria
- Induction of bacteria with 1mM IPTG
- Bacteria lysis (lysozyme 1mg/ml, DNase I, EDTA 0.2 M pH 8, IP), sonication
- Centrifugation 10 min, 10 000 RPM 4°C
- ⇒ soluble (S) and insoluble (I) fractions



Production conditions of elastic protein are validated

Elastic protein characterization

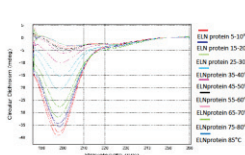
Coacervation capacity



Elastic protein purification by Inverse Transition Cycling (ITC): CTRL is cell lysate, S1 is supernatant containing impurities and C1 is pellet containing pure elastic protein

Intrinsic capacity of coacervation similar to the human tropoelastin

Circular Dichroism

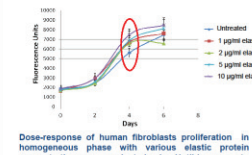


Circular dichroic spectrum of elastic protein: Elastic protein was dissolved in PBS pH 7.4 at 0.2 mg/ml and spectra obtained from 5 to 85°C (thermic denaturation).

Same folding as human tropoelastin: Polyproline type II helix [6]

Elastic protein compatibility with human fibroblast cultures

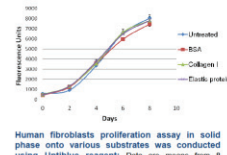
Proliferation in homogeneous phase



Dose-response of human fibroblasts proliferation in homogeneous phase with various elastic protein concentrations was conducted using Uptillblue reagent. Data are means from 8 replicates.

Slight increase of proliferation in homogeneous phase dose-response

Proliferation in solid phase



Human fibroblasts proliferation assay in solid phase onto various substrates was conducted using Uptillblue reagent. Data are means from 8 replicates.

No effect of elastic protein on proliferation in solid phase

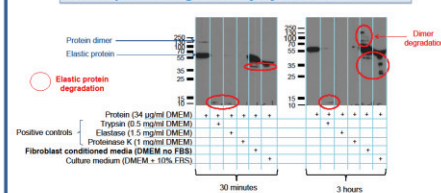
Interaction with a membrane integrin



Characterization of human fibroblasts adhesion onto elastic protein: CTRL is crude plate. Cells were cultured for 48 hours onto different substrates prior total protein extraction and western blot analysis of integrin αv . Immunodetection of GAPDH was performed to ensure equal protein loadings.

Increased expression of integrin αv subunit. This integrin is normally recognized by the RKRK sequence (exon 36) [3]

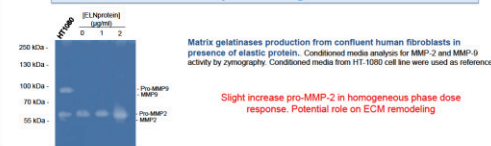
Elastic protein degradability by human fibroblasts



Elastic protein degradability by human fibroblast: Elastic protein incubated with control enzymes and fibroblast conditioned medium and western blot analysis targeted to peptide Flag

Elastic protein can be degraded by fibroblasts-produced enzymes

Influence of elastic protein on gelatinases secretion



Matrix gelatinases production from confluent human fibroblasts in presence of elastic protein. Conditioned media analysis for MMP-2 and MMP-9 activity by zymography. Conditioned media from HT-1080 cell line were used as reference.

Slight increase pro-MMP-2 in homogeneous phase dose response. Potential role on ECM remodeling

Conclusions and perspectives

Validation of physico-chemical properties:

- Conservation of intrinsic capacity of coacervation similar to the human tropoelastin,
- Protein folding is characterized by polyproline type II helix conformation.

Biological interest of elastic protein:

- Slight increase of proliferation in homogeneous phase dose-response,
- Increased expression of integrin αv subunit, probably recognized by the RKRK motif in C-terminus of the elastic protein,
- The chimeric protein is recognized by fibroblasts-produced enzymes, potential role in ECM remodeling.

- Although its sequence is simplified, the elastic protein retains human tropoelastin characteristics and biological interest.

These features make the elastic protein a good candidate to mimic cell environment microelasticity and cell-driven degradation of an elastic biomaterial.

- Intrinsic elastic physical properties of chimeric protein in 2D and 3D cultures are under investigation.

References and Acknowledgments

- [1] Yeo G.C. *et al.*, Adv Colloid Interface Sci (2010) [2] Hinek *et al.*, Exp Cell Res (1992)
[3] Broekelmann *et al.*, J Biol Chem (2005) [4] Wise et Weiss, Adv Protein Chem Struct Biol (2009) [5] Meyer et Chikoti, Nat Biotechnol (1999) [6] Bocchicchio et Pepe, Chirality (1999)



- **Annexe 5:** Lorion C., Faye C., Maret B., Trimaille T., Régnier T., Sommer P., Debre R. **Biosynthetic support based on dendritic poly(L-lysine) improves human skin fibroblasts attachment.** *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 25(2): 136-14 (octobre 2013).

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2014
Vol. 25, No. 2, 136–149, <http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2013.843966>



Biosynthetic support based on dendritic poly(L-lysine) improves human skin fibroblasts attachment

Chloé Lorion^a, Clément Faye^b, Barbara Maret^{b,c}, Thomas Trimaille^{a,d}, Thomas Régnier^b, Pascal Sommer^a and Romain Debre^{a,*}

^aLBTI, UMR5305 CNRS Université Lyon 1, 69367 Lyon Cedex 7, France; ^bCOLCOM, Cap Alpha, 34830 Clapiers, France; ^cIBMM, UMR 5247 CNRS Université Montpellier II, 34095 Montpellier Cedex 5, France; ^dICR, UMR 7273 CNRS Université Aix-Marseille, 13397 Marseille Cedex 20, France

(Received 17 July 2013; accepted 7 September 2013)

Poly(L-lysine) (PLL) dendrigrafts (DGLs) are arborescent biosynthetic polymers of regular and controlled structures. They have specific properties such as biocompatibility and non-immunogenicity, and their surface density of NH₂ functions can be easily modified and therefore appears as a powerful tool for the functionalization of hydrophobic polymers used in the context of tissue engineering. In this study, we evaluated several criteria of human skin fibroblasts when cultured with DGL of generations 2, 3 and 4, with linear PLL polymer as reference. In aqueous phase, DGLs and PLL displayed a similar cytotoxicity towards fibroblasts. Plastic culture plates grafted with DGLs were further characterized as homogeneous surfaces by atomic force microscopy and surface characterization by amino density estimation by colorimetric assay. Proliferation of fibroblasts was increased when cultured onto PLL and DGLs monolayers when compared with crude plates. Cellular adhesion was increased by 20% on DGLs in comparison to PLL. Integrin $\alpha 5$ subunit protein expression level was increased after 48 h of culture on DGLs, in comparison to control or PLL-coated surfaces. The presence of DGLs did not lead to overexpression or activation of matrix metalloproteinases 2 and 9. Finally, fibroblasts adhesion was increased by 40% on poly-(lactic-co-glycolic acid) matrices functionalized with DGLs when compared to PLL. Overall, these features make DGL promising candidates for the surface engineering of biomaterials in tissue engineering.

Keywords: poly(L-lysine) dendrigrafts; fibroblasts; cell adhesion; integrin; DL-lactide/glycolide copolymer

1. Introduction

In recent years, synthetic polymers have offered new insights in the field of biomaterials, as simple supports for *in vitro* cultures or as body implants, the most complex biomedical application. These materials have the advantages of being readily formable and standardized. However, for the most part of them, they are not able to generate biochemical signals required to control specific cell adhesion, proliferation, migration and differentiation. To overcome this lack of biological activity, new hybrid materials have been developed to recreate an extracellular environment as close as possible to

*Corresponding author. Email: r.debre@ibcp.fr

the extracellular matrix from the native tissue.[1,2] This strategy consists in using synthetic polymers as framework on which small molecules are associated by surface engineering to mimic the main actors of the extracellular matrix, such as growth factors (EGF, FGF, TGF beta, ...) and fragments of macromolecules (fibronectin, collagen, polysaccharides, ...). Synthetic polymers are classified into four types of architectures: linear, cross-linked, branched and dendritic structures. Dendrimers fall into this latter category and are considered as the most recent structures. These are nano-spherical macromolecules whose architecture is very controlled with adjustable parameters in terms of molecular weight, biodegradability and biocompatibility. The main feature doing dendrimers extremely promising tools for biomedical applications is undoubtedly their relative monodispersity. The biological activities are closely related to the structure/function relationship and dendrimers based on their spherical structure that may be similar to globular proteins. Disposing of molecules whose structures are highly reproducible and stable should allow better controlling the behaviour of the agent or material for biomedical engineering.[3,4] Dendrimers are however widely underrepresented in clinical trials for the benefit of linear polymers such as polyethylene glycol, poly (glutamic acid), poly-(L-lysine) (PLL) or polyethylenimine linear. The main reason being that the multi-stage process needed to produce dendrimers is relatively time-consuming and costly. Dendrimer polymers, the most recently discovered subset of dendritic polymers, have a less controlled structure than dendrimers, but can achieve dendrimer-like properties at a much lower cost.[5]

Poly(L-lysine) dendrigrafts (DGLs) are original polymers obtained by iterative polycondensation of N-carboxyanhydride groups in water, that can be synthesized at the multigram-scale.[6] The flexible polycationic structure of DGLs makes them very attractive compounds to be tested for different biological applications: antigen carrier for antibody production [7]; nanovector for gene delivery [8–11]; transport of contrast agents [12,13]; and biomaterial functionalization for drug release.[14,15] Although DGLs have been tested *in vivo*, mainly as a vehicle, data regarding cell behaviour towards these dendrimers are lacking. In a first part, the present study aimed at characterizing DGLs as biosynthetic support for human skin fibroblasts *in vitro* culture and in a second part, at using DGLs as an interface for cell attachment onto aliphatic polymer films.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of DGL grafted microplates

Generation 2–4 of DGL were grafted on polystyrene activated microplates (Immobilizer™ plates with epoxyde reactive groups, Thermo Scientific, France). DGLs were diluted at 10 mg/ml in a carbonate–bicarbonate buffer (0.1 M, pH 9.6) before filling wells with 200 µl. Grafting was performed for 2 h at room temperature. After grafting, unreacted DGLs were removed by washing wells twice with carbonate–bicarbonate buffer (0.1 M, pH 9.6) then 1 h in 0.25 M carbonate–bicarbonate/methanol buffer (1:1 in volume, pH 11.25) in an ultrasonic bath at room temperature. Blanks were done using carbonate buffer instead of DGL solution during the grafting step. Wells were finally washed several times with phosphate-buffered saline (PBS) (10^{-2} M, 150 mM NaCl adjusted to pH 7.4) then twice with water before freeze drying and conditioning under vacuum.

2.2. Surface characterization by ADECA

Amino density estimation by colorimetric assay (ADECA) was carried out as described previously.[16–18] Briefly, ADECA method is performed after washing microplate wells once with ultrapure water and once using 300 µl per well of washing solution (10% (v/v) methanol, 5% (v/v) acetic acid and 85% (v/v) H₂O). Then, the staining step was performed using 200 µl per well of CBB staining solution (500 mg/l of CBB dissolved in 10% (v/v) methanol, 5% (v/v) acetic acid and 85% (v/v) H₂O) during 5 min at room temperature. Excess of dye was removed by washing five times with wash solution (300 µl per well) followed by three times with ultrapure water. The detection step was performed by adding 300 µl of detection buffer (mixture of 0.25 M carbonate bicarbonate buffer at pH 11.25 with CH₃OH, v/v, 1:1) per well. After agitation, 250 µl of solution was taken out from each well and placed in a new polystyrene microwell previously conditioned with 3 N HCl (20 µl per well). All spectrophotometric measurements were recorded at 611 nm with a Tecan Infinite 200TM absorbance microplate reader. Amino density was obtained using a calibration curve.

2.3. Atomic force microscopy

Grafting of several generation of DGL (2–4) was performed on a glass slide (Corning® Epoxide Slides Reference 40042) using the same chemistry and the same protocol as describe in Section 2.1. Slides were rinsed with deionized water, and then dried with compressed air. The present results were obtained by surface analysis using a Digital 3100 (Veeco Instruments) AFM working in ambient air conditions and at room temperature in tapping mode. Classical tip (Nanosensors FM) with a curvature radius of 5 nm was used for these experiments.

2.4. Cell culture

Human skin fibroblasts (HSFs) were isolated from foreskin surgical explant. All experiments were done in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. Informed consent was received. Cell culture medium consists of a ratio 1:1 of Dulbecco's Modified Eagle's Medium with GlutamaxTM-I and Ham's F-12 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), 100 IU/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). Cells were used below 20 population doubling level.

2.5. Viability and proliferation assays

Cells were seeded in 96-well plates at 4×10^3 cells/cm² and incubated overnight in complete medium to let the cells adhere. The next day, various concentrations of PLL and DGL generation 2–4 diluted in complete medium were added for two days prior viability assays with UptiBlue reagent (Interchim, Montluçon, France) following manufacturer recommendations. After 3 h incubation with UptiBlue, supernatants were harvested and fluorescence was measured in a Tecan Infinite M1000 microplate reader at 540 nm and 590 nm for excitation and emission wavelengths, respectively. Proliferation assays were conducted onto surfaces grafted with PLL and DGL of generation 2–4, crude plate was used as control. UptiBlue test was performed as described above every two days starting from the day after seeding (day 0).

2.6. Adhesion assays

Cellular adhesion test using the Percoll method was adapted from Goodwin and Pauli [19]. Briefly, cells were detached with trypsin/EDTA solution and transferred in a tube containing Soybean Trypsin inhibitor and medium without FBS. Cells were centrifuged for 5 min/1000 rpm/25 °C. Cells were resuspended in medium without FBS at a density of 3×10^5 cells/ml. 100 µl/well of cell suspension were dispatched in a 96-well plate grafted with PLL or DGL of generation 2–4. Plates were blocked with 1% BSA in PBS for 1 h and rinsed three times with PBS prior cell seeding. Cells were allowed to attach for 5 min prior adding the Percoll FM solution (1.10 g/l) to separate non-adherent cells. Adherent cells were then fixed with the Percoll Fix solution (1.13 g/l) containing 10% glutaraldehyde. Supernatants were discarded and cells were washed three times with PBS prior staining with crystal violet dye. Exceeding dye was washed with water and the cell-trapped dye was dissolved with 2% sodium dodecyl sulphate (SDS). Absorbance was read at 570 nm with microplate reader (Infinite M1000, Tecan).

2.7. Lactide/glycolide copolymer films preparation and coating

Round glass coverslips (18 mm) were covered by a biopolymer film of 50/50 DL-poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) (100,000 g/mol) (Purac, Lyon, France) obtained by solvent cast from 2% (w/v) chloroform solution. Coverslips were left under the chemical hood at room temperature until evaporation of the solvent. So obtained PLGA films were further coated by passive adsorption with 1 mg/ml PLL or DGL-G3 in PBS for 2 h at room temperature. Coverslips were washed three times with PBS and blocked with 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature. Finally, surfaces were washed three times with PBS prior adhesion test with the Percoll test as described in 2.6 except that cells were allowed to attach 20 min prior adding the Percoll FM solution.

2.8. Confocal microscopy

Cell spreading was evaluated on Millicell EZ 8-well glass slides (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) covered or not with PLGA films and further coated with PLL and DGL-G3 and blocked with 1% BSA in PBS (see 2.7). Medium was aspirate and wells were gently rinsed once with PBS at 30 and 60 min post-seeding. Cells were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min and rinsed three times with PBS. Hoechst (Sigma-Aldrich) and Phalloidin-TRITC (Sigma-Aldrich) dyes were added to cells at 1 µg/ml in PBS for 15 min at room temperature. Cells were rinsed three times with PBS and slides were mounted with Mountant, Permafluor solution (LabVision, Thermo-Scientific, Illkirch, France). Images were acquired with Olympus FV10i confocal microscope using a 60× oil immersion objective.

2.9. Western blotting

Six-well plates were coated with PLL and DGL of generation 2–4 with 10 µg/ml solutions in PBS for 2 h at room temperature, and rinsed three times with PBS. Cells were plated at a density of 3×10^4 cells/cm² and cultured for 48 h in medium containing 2% FBS. Total protein was extracted with lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7.4, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 1% NP-40) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche) and 1 mM sodium orthovanadate. Cells were scraped, collected and

incubated on ice for 15 min mixing every 5 min. Then, cells were centrifuged 20 min/10,000 rpm/4 °C. The supernatant was collected, and protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce).

For western blot analyses, 6 µg of each protein sample were separated by 8% SDS-PAGE. Electrophoretically resolved bands were then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes by electroblotting. Membranes were blocked for 45 min in tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) and 5% (w/v) non-fat powdered milk. Then, they were incubated at 4 °C overnight with the primary antibodies in TBS-T containing 2% (w/v) non-fat powdered milk: rabbit anti-integrin beta 1 antibody (ab52971; abcam), mouse anti-integrin alpha 5 antibody (ab93943; abcam) at dilution of 1:1000 and mouse anti-GAPDH antibody (MAB374; Chemicon International) at dilution of 1:7500. Membranes were then washed three times in TBS-T, and incubated with corresponding horseradish peroxidase conjugated secondary antibody, for 1 h at room temperature in TBS-T. Membranes were washed five times in TBS-T. Finally, proteins were detected by Enhanced Chemiluminescence kit (SuperSignal West Femto Chemiluminescent, Pierce).

2.10. Zymography

Cells were seeded in 96-well plates at a density of 3×10^4 cells/cm² and incubated in complete medium for 48 h onto surfaces grafted with PLL and DGL of generation 2–4, then cells were rinsed three times with PBS and a further 48 h incubation without FBS was performed prior conditioned media harvest. Samples were separated through a 10% SDS-polyacrylamide gel containing 1 mg/ml gelatin as substrate. Following electrophoresis, the gels were washed in 2.5% Triton X-100 for 1 h at room temperature; further incubated at 37 °C overnight in 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl (pH 7.6); stained with 0.1% Coomassie blue G-250 in methanol/acetic acid/water (20/10/70; v/v/v); and destained in the same buffer without Coomassie Blue. Gelatinolytic activities of MMP-2 and MMP-9 were evidenced as white zones of lysis indicating gelatine degrading activity. A fibrosarcoma cell line HT-1080 was used as reference.

2.11. Statistical analysis

Statistical evaluation was performed with GraphPad PRISM software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). ANOVA test with Newman-Keuls *post hoc* test were applied for *p*-values determination. All results were reported as mean ± SD. Data were considered significantly different if the *p*-value was <0.05.

3. Results and discussions

3.1. Determination of IC₅₀ values

Any chemical entity induces cytotoxic response in a dose and cell-specific manner. In order to evaluate the relative cytotoxicity of DGLs, increasing concentrations of DGL-G2, -G3 and -G4 were added to HSFs culture medium and cell viability was monitored after 2 days using an UptiBlue assay reflecting the metabolic activity (Figure 1). PLL was used as reference since this linear polymer is commonly used in cell culture procedures. In our conditions, IC₅₀ were determined at 18, 25, 30 and 18 µg/ml for PLL, DGL-G2, -G3 and -G4, respectively. A previous study by Fischer and co-workers

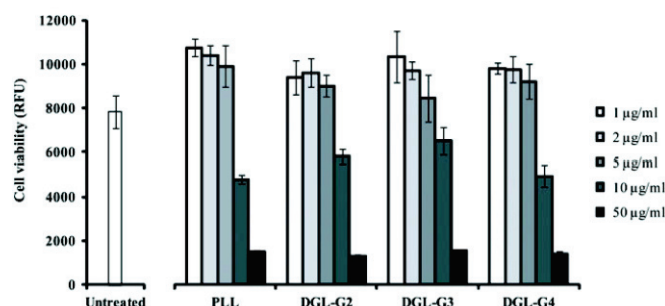


Figure 1. Cell viability assays were conducted using UptiBlue reagent. Cells were incubated for 2 days with medium alone or supplemented with PLL and DGL of generation 2–4 at varying concentration range from 1 to 50 µg/ml. Data are expressed as means \pm SD of 4 replicates and representative of 3 independent experiments.

used the L929 mouse fibroblasts strain with a similar metabolic activity test and reported an IC_{50} of 38 µg/ml, calculated as PLL concentration which inhibits 50% of cell growth after 24 h.[20] At low concentrations (1–5 µg/ml), DGLs and PLL induced an increase of cell viability of approximately 25% in comparison to untreated cells. The direct effect of low concentrated PLL solutions (below 10 µg/ml) on fibroblasts proliferation is poorly documented; though, a positive effect at 1 µg/ml on human mesenchymal stem cells adhesion and proliferation has been reported.[21] In conclusion, in homogeneous phase, DGLs and PLL display similar cytotoxic profiles, thus validating the range of use of DGLs in the same order of magnitude as PLL.

3.2. Characterization of DGL-grafted surfaces

Chargeable polymers are commonly used as coated or grafted supports onto which cells will adhere. Accordingly, polystyrene microplates were thus grafted with DGL and amino-group density was assessed by ADECA (Figure 2(A)) [17,18]. Measurements for DGL-G2, -G3 and -G4 surfaces provide densities of 3.66 ± 0.18 , 4.04 ± 0.23 and 7.00 ± 0.45 amino groups per nm², respectively. Blank was performed onto crude microplate. These results are in accordance with previous results considering a monolayer of DGL onto polystyrene support.[16]

DGL-functionalized glass surfaces were prepared as described by Coussot and co-workers,[16] and were analysed by AFM (Figure 2(B)). The measured root-mean-square roughness parameters (Rq) for blank, DGL-G2, -G3 and -G4 were 0.184, 0.457, 0.448 and 0.512, respectively. This indicates that surface topographies were homogeneous and different from blank. These results are in accordance with DGL monolayer structures described in Coussot and co-workers [16]. Combined to ADECA quantification and previous observations, our data imply that grafting of DGLs leads to a homogenous monolayer onto polystyrene microplate surface.

3.3. HSFs proliferation onto DGL supports

Cell proliferation was determined by UptiBlue assay after culture for 2 and 4 days onto polymer-grafted surfaces (Figure 3). A slight but significant increase of proliferation

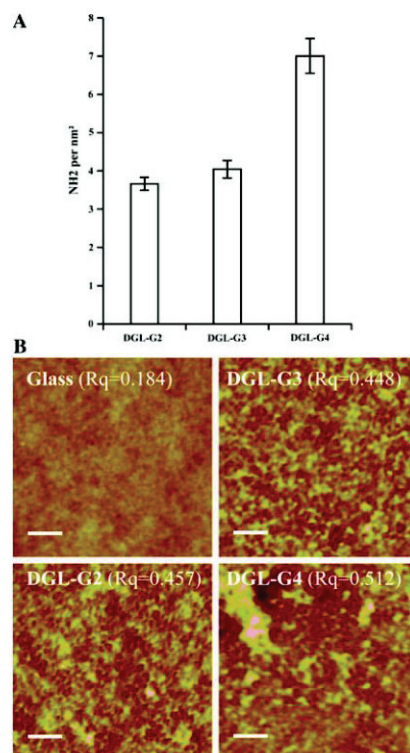


Figure 2. DGL-grafted surfaces analyses. (A) Amino density estimation of microplates grafted with DGL of generation 2–4. Blank from crude microplate was subtracted. (B) Atomic force microscopy measurements on surfaces of crude glass and coated with DGL of generation 2–4. Rq is root mean square roughness. Scale bars indicate 100 nm.

was observed as early as 2 days post seeding onto cationic polymers. This increase was confirmed after 4 days and represented a 33% gain of the measured metabolic activity when compared to the control. These data are consistent with previous observations considering PLL coated surfaces [21]; however, the mechanism leading to such an increase is not known. Recently, PLL and DGL-G4 have been used to increase the adsorption of melanocortin peptides to form multi-layered films onto glass surface for the culture of dental fibroblasts.[14] Same strategy was then employed with DGL-G5 to trap bone morphogenic protein 2 in nanoreservoirs for long term delivery in bone regeneration.[15] This implies that polycation polymers can passively trap growth factors. In our conditions, an explanation for proliferation improvement may arise from the interaction between polymers and growth factors contained in FBS, and making them more available for the cells. This hypothesis is further strengthened by the result from

Lu and co-workers showing that no increase of proliferation is observed in presence of PLL when cells are cultured in serum free medium.[21]

3.4. HSFs initial adhesion and spreading

Initial adhesion of HSF cells onto DGLs was conducted by the Percoll method that provides a sensitive semi-quantification brought by phase separation of non-adherent cells and the measurement of incorporated dye (crystal violet) into adherent cells by absorbance monitoring at 570 nm.[19] Standard polystyrene culture plates are usually treated with trade-dependent specific methods to improve cell adhesion. To bypass this parameter, plates were blocked with BSA to normalize the results. The time of observation was fixed at 5 min post-seeding and was determined by the duration necessary for attaching 50% of cells onto PLL surface in our experimental conditions (data not shown). Our results showed that the various generations of DGL displayed stronger adhesive properties (15–20%) than PLL after 5 min (Figure 4(A)). Same results were obtained with coated surfaces indicating that grafting is not a necessary step to bring adhesive properties (not shown). Cell adhesion onto polylysine substrates is considered as a quick phenomenon and interpreted as the interaction between the polyanionic cell surfaces and the polycationic layer brought by amino groups of polylysine.[22] Interestingly, PLL surfaces were previously demonstrated to offer lower density of amino groups per nm² than DGLs [16]; thus, we assume that DGL surfaces are more prone to attach cells by electrostatic forces in the initial phase of adhesion.

Cells were then observed at a later state of adhesion by confocal microscopy (Figure 4(B)). At 30 min, cells presented circular cytoplasmic extensions with actin filament structures on PLL and DGLs surfaces while cells on control had round shape associated with a diffuse actin network. These data are consistent with former spreading test on PLL reporting an increase of the passive early cell attachment and spreading.[23] Area covered by cells still grew during the first 60 min incubation; however, no

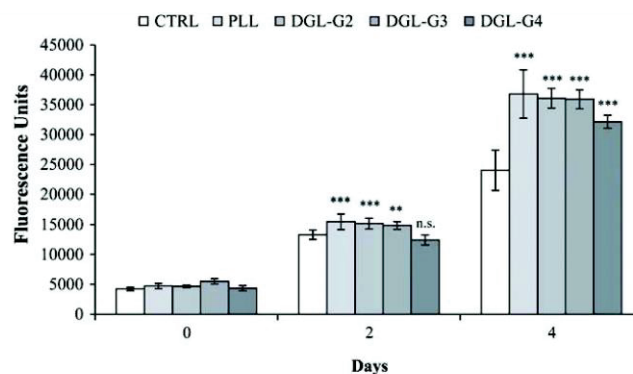


Figure 3. Cell proliferation assays onto various substrates was conducted using Uptäblue reagent. Data are means from 8 replicates and representative of 3 independent experiments (mean \pm SD). ANOVA test with Newman-Keuls *post hoc* test were performed for *p*-values determination. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, and *n.s.* is non-significant. Control (CTRL) is crude plate.

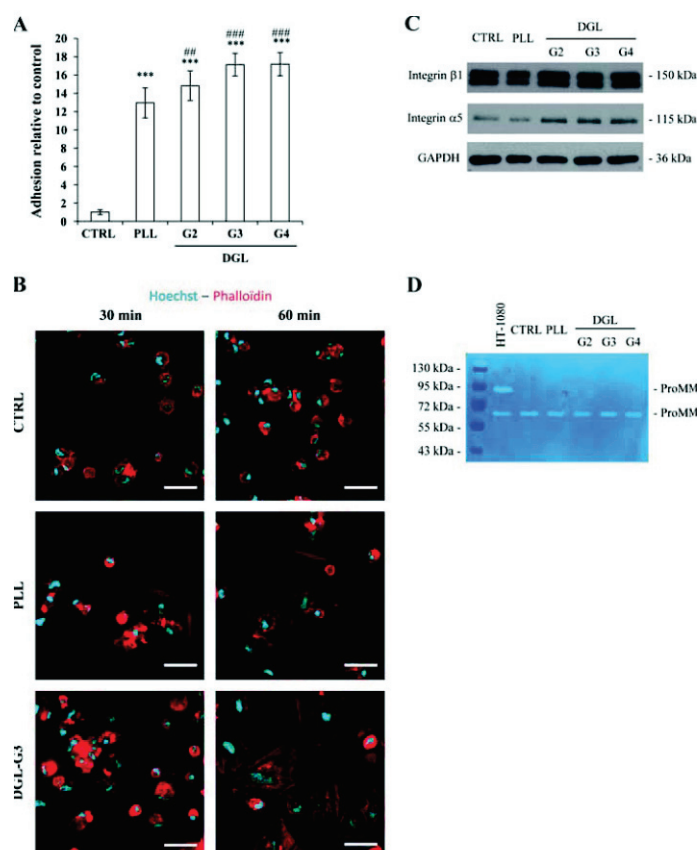


Figure 4. (A) Cell adhesion onto various substrates was assessed using the Percoll method and crude plate as control. Cells were seeded for 5 min. After fixation and staining using Crystal Violet, the incorporated colourant was dissolved and absorbance at 570 nm was measured. Data are means from 8 replicates and representative of 3 independent experiments (mean \pm SD). The results are expressed in fold increase relative to control. ANOVA test with Newman-Keuls *post hoc* test were performed for *p*-values determination. ****p* < 0.001 relative to control condition, and ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 relative to PLL condition. (B) Cell spreading was observed by confocal microscopy. Cells were seeded onto different substrates and fixed at indicated time. Cell nuclei and actin networks were counterstained using Hoechst dye (cyan) and rhodamine-conjugated phalloidin (red), respectively. Scale bars indicate 50 μ m. (C) Cells were culture for 48 h onto different substrates prior total protein extraction and western blot analyses of integrin $\beta 1$ and integrin $\alpha 5$. Immunodetection of GAPDH was performed to ensure equal protein loadings. (D) Conditioned media analysis for MMP-2 and MMP-9 activity by zymography. Conditioned medium from HT-1080 cell line was used as reference.

remarkable difference was observed between PLL and DGLs conditions while spreading on control plates was still delayed. Once cells approached their maximal area, they presented less regular membrane edges. Cell spreading can be classified into either isotropic or anisotropic modes.[24] The isotropic spreading is a rapid phase characterized by continuous segment of the cell edge giving a round shape. Interestingly, this spreading mode is facilitated by serum deprivation in line with our experimental conditions. Dubin-Thaler and co-workers observed a switch toward an anisotropic spreading for longer incubations. Anisotropic spreading is represented by a slower growth, filopodial protrusions and edge retractions as observed after 30 min incubation of HSF on the various substrates (Figure 4(B)). After one hour, most of cells displayed an anisotropic spreading morphology on DGL-G3 surface while this phenomenon was particularly delayed on control.

Further spreading, crawling and migration processes are controlled by active mechanisms that require a strong attachment to the substrate. Extracellular matrix macromolecules, the natural substrates of mesenchymal cells, are mainly linked to cells through integrins that are protein heterodimers localized at the cell membrane. The fibronectin receptor, $\alpha 5/\beta 1$ integrin, is highly expressed in fibroblasts and promotes their adhesion and motility during ECM remodelling and wound healing through an Arg-Gly-Asp (RGD)-cell binding sequence on fibronectin.[25,26] NH_2 -terminated self-assembled monolayers were shown to have a strong affinity toward $\alpha 5/\beta 1$ integrin; on the contrary, PLL is a well-known integrin-independent substrate.[27] To address whether DGLs are able to trigger this receptor, cells were cultured for 2 days on various substrates and the expression of $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrin subunits was analysed by western blotting (Figure 4(C)). The $\alpha 5$ subunit was slightly overexpressed in cells grown on DGLs surfaces while an identical basal expression was observed in cells cultured on control and PLL. Besides, no variation in $\beta 1$ subunit expression was observed. However, the $\beta 1$ subunit is able to bind 12 different α subunits,[28] and has been shown to be synthesized in excess over α subunits in fibroblasts.[29] Thus, the larger amount of $\alpha 5$ subunit detected in DGL-cultured cells suggests an increase of $\alpha 5/\beta 1$ integrin complex formation at the cell surface. Whether DGLs trigger directly the $\alpha 5/\beta 1$ integrin has to be further examined. Few examples in the literature have reported integrin-mediated signal due to synthetic supports, of which polyurethane-gold nanocomposites were recently shown to activate the $\alpha 5/\beta 3$ integrin in endothelial cells and to a lesser extent in fibroblasts.[30] In response to this activation, an increase in matrix metalloproteinase (MMP)-2 was observed.

An increase of MMP expression level or activation could be considered as a useful process for ECM remodelling in wound healing process or exogenous scaffold penetration; on the opposite, MMP are often considered as a pejorative marker of pathological mechanisms such as inflammation and cancer cell invasion.[31–34] We thus questioned whether gelatinases (MMP-2 and -9) expression and activity levels were modified after 2 days culture on the different supports. Zymography analyses from cell conditioned media were performed (Figure 4(D)). Results showed no difference, neither in proMMP-2 expression nor in proMMP-2 activation. In two-dimensional cultures, cells do not require MMP-2 overexpression to invade a preformed ECM, thus MMP-2 steady expression would be considered as a good indicator. Besides, the proMMP-9 isoform was not observed in any tested condition.

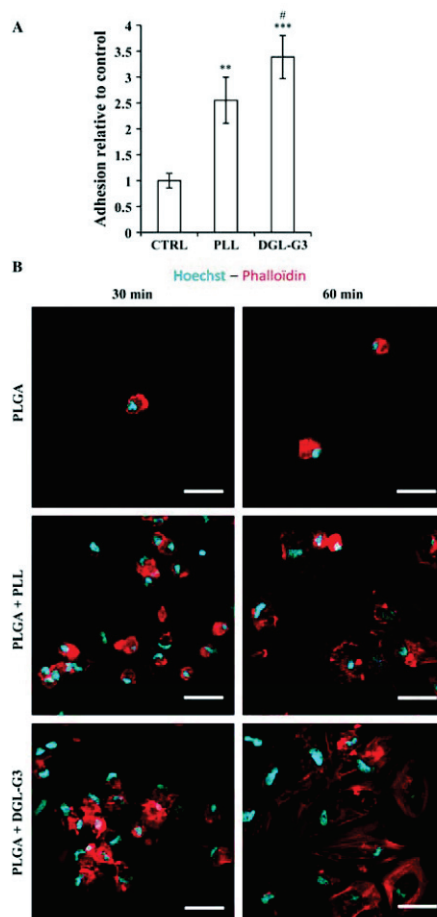


Figure 5. Comparison of human fibroblasts adhesion onto PLGA substrate functionalized with PLL and DGL-G3. (A) Cells were seeded for 20 min. After fixation and staining using Crystal Violet, the incorporated colourant was dissolved and absorbance at 570 nm was measured. Data are means from 3 replicates (mean \pm SD). The results are expressed in fold increase relative to control. ANOVA test with Newman-Keuls *post hoc* test were performed for *p*-values determination. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relative to control condition, and # $p < 0.05$ relative to PLL condition. (B) Cell spreading was observed by confocal microscopy. Cells were seeded onto different substrates and fixed at indicated time. Cell nuclei and actin networks were counterstained using Hoechst dye (cyan) and rhodamine-conjugated phalloidin (red), respectively. Scale bars indicate 50 μ m.

3.5. Functionalization of hydrophobic polymer with DGLs

Many synthetic polymers have been developed and used as biomaterials to serve as structural element with limited biological interactions with living function. However, new strategies in tissue engineering necessitate bioactive functions that may help to regenerate the targeted tissue of which the first step consists in improving biocontact properties of the material.[35] Among them, PLGA is a typical example of attractive biomaterial for skin tissue engineering due to its rather fast degradation properties, but which is known to present poor surface properties regarding cell adhesion. To this matter, we conducted the functionalization of aliphatic polyester films, composed of 50/50 PLGA, by adsorption of DGL-G3. The surface of the films was assessed by contact angle with water or diiodomethane drops. Contact angle values shifted from $71.0 \pm 0.7^\circ$ to $46.4 \pm 2.4^\circ$ (water drop) and from $34.2 \pm 0.4^\circ$ to $42.4 \pm 1.1^\circ$ (diiodomethane drop) following DGL G3 coating, clearly indicating surface adsorption of the hydrophilic dendrimer on the PLGA surface. The passive adsorption of DGLs at the polymer surface was not surprising since Mendoza-Palomares and co-workers obtained DGL-G5 nanoreservoirs at the surface of electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibres thanks to a layer-by-layer adsorption process.[15] However, the impact of DGL-functionalization on cell adhesion onto the polymer has never been explored. Cell adhesion at the surface of naked PLGA films (control), or coated with PLL or DGL-G3, was assessed by the Percoll method as described above after 20 min post-seeding (Figure 5(A)). Results showed that cell number at the film surface was significantly higher in presence of PLL or DGL-G3 than control. Using the same conditions, actin network and nuclei were then stained and observed by confocal microscopy after 30 and 60 min post-seeding (Figure 5(B)). The profiles of cell spreading and actin network organization were similar to those observed in Figure 4(B). These data show that adsorption of polycationic polymers, PLL and DGLs, provided better biocontact properties to the hydrophobic support by improving cell adhesion. These results are in total agreement with a previous study reporting an increase of fibroblasts adhesion and viability when the surface of PLA films was modified with amine-terminated branched architecture.[36] The authors attributed this increase to electrostatic interactions between amine groups and cell membrane glycoproteins. To note, DGL-G3 allowed a significant increase of HDFs adhesion compared to PLL. As already discussed above, this difference could be partly attributed to the higher density of amino groups per surface unit of DGL.[16]

4. Conclusions

Surface engineering of polymeric biomaterials requires controlled chemical nanolayers for which DGLs should provide many advantages. In this study, we determined the characteristics of DGLs as supports for HSFs cultures. Toxicity of DGLs was similar to PLL when added to the cell culture medium. In solid phase, DGLs-grafted or -coated plastic surfaces provided homogeneous surfaces with high density of amino groups thus improving early cell adhesion and spreading processes. Longer period of cultures onto DGLs showed an increase in cell proliferation comparable to PLL and an increase in alpha 5 integrin subunit protein level that was not observed onto PLL-treated surfaces. Finally, passive adsorption of DGL onto PLGA films improved hydrophilic properties of the substrate and allowed a better adhesion of skin cells. However, the real benefit of DGLs in biomaterials field is not restricted to cell adhesion improvement, but DGLs provide unlimited strategies to bring bioactive molecules in contact with cells.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Nina Attik, from the University of Lyon, for her kind advices about confocal microscopy; and Dr Michel Ramonda, from the University of Montpellier, for his expertise about atomic force microscopy. This work was supported by a grant from The French National Research Agency (ANR- 11-TECS-016), and the French National Center for Scientific Research.

References

- [1] Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 2005;23:47–55.
- [2] Rice JJ, Martino MM, De Laporte L, Tortelli F, Briquez PS, Hubbell JA. Engineering the regenerative microenvironment with biomaterials. *Adv. Healthcare Mater.* 2013;2:57–71.
- [3] Mintzer MA, Grinstaff MW. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem. Soc. Rev.* 2011;40:173–190.
- [4] Oliveira JM, Salgado AJ, Sousa N, Mano JF, Reis RL. Dendrimers and derivatives as a potential therapeutic tool in regenerative medicine strategies—a review. *Prog. Polym. Sci.* 2010;35:1163–1194.
- [5] Teertstra SJ, Gauthier M. Dendrigraft polymers: macromolecular engineering on a mesoscopic scale. *Prog. Polym. Sci.* 2004;29:277–327.
- [6] Collet H, Souaid E, Cottet H, Deratani A, Boiteau L, Dessalces G, Rossi JC, Commeyras A, Pascal R. An expeditious multigram-scale synthesis of lysine dendrigraft (DGL) polymers by aqueous N-carboxyanhydride polycondensation. *Chemistry.* 2010;16:2309–2316.
- [7] Romestand B, Rolland JL, Commeyras A, Coussot G, Desvignes I, Pascal R, Vandenabeele-Trambouze O. Dendrigraft poly-L-lysine: a non-immunogenic synthetic carrier for antibody production. *Biomacromolecules.* 2010;11:1169–1173.
- [8] Huang R, Liu S, Shao K, Han L, Ke W, Liu Y, Li J, Huang S, Jiang C. Evaluation and mechanism studies of PEGylated dendrigraft poly-L-lysines as novel gene delivery vectors. *Nanotechnology.* 2010;21:265101.
- [9] Huang R, Ma H, Guo Y, Liu S, Kuang Y, Shao K, Li J, Liu Y, Han L, Huang S, An S, Ye L, Lou J, Jiang C. Angiopep-conjugated nanoparticles for targeted long-term gene therapy of Parkinson's disease. *Pharm. Res.* 2013;30:2549–2559.
- [10] Liu Y, Guo Y, An S, Kuang Y, He X, Ma H, Li J, Lv J, Zhang N, Jiang C. Targeting caspase-3 as dual therapeutic benefits by RNAi facilitating brain-targeted nanoparticles in a rat model of Parkinson's disease. *PLoS ONE.* 2013;8:e62905.
- [11] Liu Y, Li J, Shao K, Huang R, Ye L, Lou J, Jiang C. A leptin derived 30-amino-acid peptide modified Pegylated poly-L-lysine dendrigraft for brain targeted gene delivery. *Biomaterials.* 2010;31:5246–5257.
- [12] Kojima C, Turkbey B, Ogawa M, Bernardo M, Regino CA, Bryant LH, Jr, Choyke PL, Kono K, Kobayashi H. Dendrimer-based MRI contrast agents: the effects of PEGylation on relaxivity and pharmacokinetics. *Nanomedicine.* 2011;7:1001–1008.
- [13] Ogawa M, Regino CA, Marcelino B, Williams M, Kosaka N, Bryant LH, Jr, Choyke PL, Kobayashi H. New nanosized biocompatible MR contrast agents based on lysine-dendri-graft macromolecules. *Bioconjugate Chem.* 2010;21:955–960.
- [14] Fioretti F, Mendoza-Palomares C, Helms M, Al Alam D, Richert L, Arntz Y, Rinkenbach S, Granier F, Haikel Y, Gangloff SC, Benkirane-Jessel N. Nanostructured assemblies for dental application. *ACS Nano.* 2010;4:3277–3287.
- [15] Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S, Fioretti F, Ladam G, Kuchler-Bopp S, Régnier T, Mainard D, Benkirane-Jessel N. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano.* 2012;6:483–490.
- [16] Coussot G, Faye C, Ibrahim A, Ramonda M, Dobrijevic M, Le Postollec A, Granier F, Vandenabeele-Trambouze O. Aminated dendritic surfaces characterization: a rapid and versatile colorimetric assay for estimating the amine density and coating stability. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;399:2295–2302.
- [17] Coussot G, Perrin C, Moreau T, Dobrijevic M, Le Postollec A, Vandenabeele-Trambouze O. A rapid and reversible colorimetric assay for the characterization of aminated solid surfaces. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;399:1061–1069.

- [18] Chazalnoel P, Coussot G, Desvignes I, Dobrijevic M, Le Postollec A, Vandenabeele-Trambouze O. Procédé de détection et de quantification d'une molécule comprenant au moins un groupement protoné sur un support solide [Method for detecting and quantifying a molecule including at least one proton group on a solid substrate]. Patent Number: WO 2009/112430 A1. 2009 Sep 17.
- [19] Goodwin AE, Pauli BU. A new adhesion assay using buoyancy to remove non-adherent cells. *J. Immunol. Methods*. 1995;187:213–219.
- [20] Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Kriegelstein J, Kissel T. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. 2003;24:1121–1131.
- [21] Lu H, Guo L, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G. Effects of poly(L-lysine), poly(acrylic acid) and poly(ethylene glycol) on the adhesion, proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 2009;20:577–589.
- [22] Mazia D, Schatten G, Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1975;66:198–200.
- [23] Cuvelier D, Thery M, Chu YS, Dufour S, Thiery JP, Bornens M, Nassoy P, Mahadevan L. The universal dynamics of cell spreading. *Curr. Biol.* 2007;17:694–699.
- [24] Dubin-Thaler BJ, Giannone G, Dobereiner HG, Sheetz MP. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophys. J.* 2004;86:1794–1806.
- [25] Kato A, Okamoto O, Ishikawa K, Sumiyoshi H, Matsuo N, Yoshioka H, Nomizu M, Shimada T, Fujiwara S. Dermatopontin interacts with fibronectin, promotes fibronectin fibril formation, and enhances cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 2011;286:14861–14869.
- [26] Takagi J. Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochem. Soc. Trans.* 2004;32:403–406.
- [27] Faucheux N, Tzoneva R, Nagel MD, Groth T. The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry. *Biomaterials*. 2006;27:234–245.
- [28] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110:673–687.
- [29] Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J. Biol. Chem.* 1989;264:380–388.
- [30] Hung HS, Chu MY, Lin CH, Wu CC, Hsu SH. Mediation of the migration of endothelial cells and fibroblasts on polyurethane nanocomposites by the activation of integrin-focal adhesion kinase signaling. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2012;100:26–37.
- [31] Antonicelli F, Bellon G, Debelle L, Hornebeck W. Elastin-elastases and inflamm-aging. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2007;79:99–155.
- [32] Fingleton B. Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr. Pharm. Des.* 2007;13:333–346.
- [33] Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008;40:1334–1347.
- [34] Helary C, Foucault-Bertaud A, Godeau G, Coulomb B, Guille MM. Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and metalloproteinases expression. *Biomaterials*. 2005;26:1533–1543.
- [35] Vladkova TG. Surface engineered polymeric biomaterials with improved biocontact properties. *Int. J. Polym. Sci.* 2010;2010.
- [36] Janorkar AV, Fritz EW, Jr, Burg KJ, Metters AT, Hirt DE. Grafting amine-terminated branched architectures from poly(L-lactide) film surfaces for improved cell attachment. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2007;81:142–152.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, S. B., M. F. Shamji, et al.** (2009). "Sustained release of antibiotics from injectable and thermally responsive polypeptide depots." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **90B**(1): 67-74.
- Almine, J. F., D. V. Bax, et al.** (2010). "Elastin-based materials." Chem Soc Rev **39**(9): 3371-9.
- Almine, J. F., S. G. Wise, et al.** (2013). "Elastin sequences trigger transient proinflammatory responses by human dermal fibroblasts." Faseb j **27**(9): 3455-65.
- Almine, J. F., S. G. Wise, et al.** (2012). "Elastin signaling in wound repair." Birth Defects Res C Embryo Today **96**(3): 248-57.
- Amruthwar, S. and A. Janorkar** (2012). "Preparation and characterization of elastin-like polypeptide scaffolds for local delivery of antibiotics and proteins." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **23**(12): 2903-2912.
- Antonicelli, F., G. Bellon, et al.** (2007). Elastin—Elastases and Inflammation—Aging. Current Topics in Developmental Biology, Academic Press. **Volume 79**: 99-155.
- Argraves, W. S., L. M. Greene, et al.** (2003). "Fibulins: physiological and disease perspectives." EMBO Rep **4**(12): 1127-31.
- Bailey, A. J.** (2001). "Molecular mechanisms of ageing in connective tissues." Mech Ageing Dev **122**(7): 735-55.
- Baldock, C., A. F. Oberhauser, et al.** (2011). "Shape of tropoelastin, the highly extensible protein that controls human tissue elasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(11): 4322-7.
- Baldwin, A. K., A. Simpson, et al.** (2013). "Elastic fibres in health and disease." Expert Rev Mol Med **15**: e8.
- Bashey, R. I., S. Torii, et al.** (1967). "Age-related collagen and elastin content of human heart valves." J Gerontol **22**(2): 203-8.
- Bashir, M. M., Z. Indik, et al.** (1989). "Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region." J Biol Chem **264**(15): 8887-91.
- Bax, D. V., D. R. McKenzie, et al.** (2009). "Linker-free covalent attachment of the extracellular matrix protein tropoelastin to a polymer surface for directed cell spreading." Acta Biomaterialia **5**(9): 3371-3381.
- Bax, D. V., U. R. Rodgers, et al.** (2009). "Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRR motif and integrin α V β 3." J Biol Chem **284**(42): 28616-23.
- Bax, D. V., Y. Wang, et al.** (2011). "Binding of the cell adhesive protein tropoelastin to PTFE through plasma immersion ion implantation treatment." Biomaterials **32**(22): 5100-11.
- Bellingham, C. M., M. A. Lillie, et al.** (2003). "Recombinant human elastin polypeptides self-assemble into biomaterials with elastin-like properties." Biopolymers **70**(4): 445-55.
- Bernstein, E. F., Y. Q. Chen, et al.** (1994). "Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin." J Invest Dermatol **103**(2): 182-6.
- Bessa, P. C., R. Machado, et al.** (2010). "Thermoresponsive self-assembled elastin-based nanoparticles for delivery of BMPs." J Control Release **142**(3): 312-8.
- Betre, H., S. R. Ong, et al.** (2006). "Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide." Biomaterials **27**(1): 91-99.

- Beuren, A. J., J. Apitz, et al.** (1962). "[The diagnosis and evaluation of different forms of supraaortic stenosis]." Z Kreislaufforsch **51**: 829-38.
- Bieth, J. G.** (2001). "[The elastases]." J Soc Biol **195**(2): 173-9.
- Bignon, M., C. Pichol-Thievend, et al.** (2011). "Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane." Blood **118**(14): 3979-89.
- Bohicchio, B. and A. Pepe** (2011). "Role of polyproline II conformation in human tropoelastin structure." Chirality **23**(9): 694-702.
- Brassart, B., P. Fuchs, et al.** (2001). "Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts." J Biol Chem **276**(7): 5222-7.
- Bressan, G. M., I. Pasquali-Ronchetti, et al.** (1986). "Relevance of aggregation properties of tropoelastin to the assembly and structure of elastic fibers." J Ultrastruct Mol Struct Res **94**(3): 209-16.
- Brinckmann, J., N. Hunzelmann, et al.** (2010). "Enhanced fibrillin-2 expression is a general feature of wound healing and sclerosis: potential alteration of cell attachment and storage of TGF-beta." Lab Invest **90**(5): 739-52.
- Broekelmann, T. J., B. A. Kozel, et al.** (2005). "Tropoelastin interacts with cell-surface glycosaminoglycans via its COOH-terminal domain." J Biol Chem **280**(49): 40939-47.
- Brooke, B. S., J. P. Habashi, et al.** (2008). "Angiotensin II Blockade and Aortic-Root Dilation in Marfan's Syndrome." New England Journal of Medicine **358**(26): 2787-2795.
- Broughton, G., 2nd, J. E. Janis, et al.** (2006). "Wound healing: an overview." Plast Reconstr Surg **117**(7 Suppl): 1e-S-32e-S.
- Brown-Augsburger, P., C. Tisdale, et al.** (1995). "Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly." J Biol Chem **270**(30): 17778-83.
- Brown, P. L., L. Mecham, et al.** (1992). "The cysteine residues in the carboxy terminal domain of tropoelastin form an intrachain disulfide bond that stabilizes a loop structure and positively charged pocket." Biochemical and Biophysical Research Communications **186**(1): 549-555.
- Cai, L., C. B. Dinh, et al.** (2014). "One-pot Synthesis of Elastin-like Polypeptide Hydrogels with Grafted VEGF-Mimetic Peptides." Biomater Sci **2**(5): 757-765.
- Callewaert, B., M. Renard, et al.** (2011). "New insights into the pathogenesis of autosomal-dominant cutis laxa with report of five ELN mutations." Hum Mutat **32**(4): 445-55.
- Cantor, J. O., B. Shteyngart, et al.** (2006). "Synergistic effect of hydrogen peroxide and elastase on elastic fiber injury in vitro." Exp Biol Med (Maywood) **231**(1): 107-11.
- Carreras, I., C. B. Rich, et al.** (2002). "Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription in aortic smooth muscle cells." J Cell Biochem **85**(3): 592-600.
- Chapman, S. L., F.-X. Sicot, et al.** (2010). "Fibulin-2 and Fibulin-5 Cooperatively Function to Form the Internal Elastic Lamina and Protect From Vascular Injury." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **30**(1): 68-74.

- Charbonneau**, N. L., C. D. Jordan, et al. (2010). "Microfibril structure masks fibrillin-2 in postnatal tissues." *J Biol Chem* **285**(26): 20242-51.
- Chatron-Colliet**, A., N. Lalun, et al. (2015). "The elastin peptide (VGVAPG)₃ induces the 3D reorganisation of PML-NBs and SC35 speckles architecture, and accelerates proliferation of fibroblasts and melanoma cells." *Histochem Cell Biol* **143**(3): 245-58.
- Cheng**, N. C., B. T. Estes, et al. (2013). "Genipin-crosslinked cartilage-derived matrix as a scaffold for human adipose-derived stem cell chondrogenesis." *Tissue Eng Part A* **19**(3-4): 484-96.
- Cheung**, K., K. C. Walley, et al. (2015). "Management of Complications of Dupuytren Contracture." *Hand Clinics* **31**(2): 345-354.
- Chow**, D. C., M. R. Dreher, et al. (2006). "Ultra-High Expression of a Thermally Responsive Recombinant Fusion Protein in *E. coli*." *Biotechnology progress* **22**(3): 638-646.
- Ciofani**, G., G. G. Genchi, et al. (2013). "Human recombinant elastin-like protein coatings for muscle cell proliferation and differentiation." *Acta Biomaterialia* **9**(2): 5111-5121.
- Ciofani**, G., G. G. Genchi, et al. (2014). "The potential of recombinant human elastin-like polypeptides for drug delivery." *Expert Opinion on Drug Delivery* **11**(10): 1507-1512.
- Cirulis**, J. T., C. M. Bellingham, et al. (2008). "Fibrillins, fibulins, and matrix-associated glycoprotein modulate the kinetics and morphology of in vitro self-assembly of a recombinant elastin-like polypeptide." *Biochemistry* **47**(47): 12601-13.
- Cirulis**, J. T. and F. W. Keeley (2010). "Kinetics and morphology of self-assembly of an elastin-like polypeptide based on the alternating domain arrangement of human tropoelastin." *Biochemistry* **49**(27): 5726-33.
- Clarke**, A. W., E. C. Arnspang, et al. (2006). "Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres." *Biochemistry* **45**(33): 9989-96.
- Clarke**, A. W. and A. S. Weiss (2004). "Microfibril-associated glycoprotein-1 binding to tropoelastin: multiple binding sites and the role of divalent cations." *Eur J Biochem* **271**(14): 3085-90.
- Clarke**, A. W., S. G. Wise, et al. (2005). "Coacervation is promoted by molecular interactions between the PF2 segment of fibrillin-1 and the domain 4 region of tropoelastin." *Biochemistry* **44**(30): 10271-81.
- Collet**, H., E. Souaid, et al. (2010). "An expeditious multigram-scale synthesis of lysine dendrigraft (DGL) polymers by aqueous N-carboxyanhydride polycondensation." *Chemistry* **16**(7): 2309-16.
- Colombatti**, A., P. Spessotto, et al. (2011). "The EMILIN/Multimerin Family." *Frontiers in Immunology* **2**: 93.
- Conley**, A. J., J. J. Joensuu, et al. (2009). "Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants." *Biotechnology and Bioengineering* **103**(3): 562-573.
- Conn**, K. J., C. B. Rich, et al. (1996). "Insulin-like growth factor-I regulates transcription of the elastin gene through a putative retinoblastoma control element. A role for Sp3 acting as a repressor of elastin gene transcription." *J Biol Chem* **271**(46): 28853-60.

- Coquerel**, B., F. Poyer, et al. (2009). "Elastin-derived peptides: matrikines critical for glioblastoma cell aggressiveness in a 3-D system." Glia **57**(16): 1716-26.
- Coussot**, G., C. Faye, et al. (2011). "Aminated dendritic surfaces characterization: a rapid and versatile colorimetric assay for estimating the amine density and coating stability." Anal Bioanal Chem **399**(6): 2295-302.
- Coussot**, G., E. Nicol, et al. (2009). "Colorimetric quantification of amino groups in linear and dendritic structures." Polymer International **58**(5): 511-518.
- Coussot**, G. I., C. Perrin, et al. (2011). "A rapid and reversible colorimetric assay for the characterization of aminated solid surfaces." Analytical and Bioanalytical Chemistry **399**(3): 1061-1069.
- Creemers**, L. B., I. D. Jansen, et al. (1998). "Gelatinase A (MMP-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue." Matrix Biol **17**(1): 35-46.
- Dantzer**, E. (2011). "[Role of skin substitutes in surgical repair of the sequelae of burn injuries]." Ann Chir Plast Esthet **56**(5): 369-81.
- de Torre**, I. G., F. Wolf, et al. (2015). "Elastin-like recombinamer-covered stents: Towards a fully biocompatible and non-thrombogenic device for cardiovascular diseases." Acta Biomater **12**: 146-55.
- de Vries**, H. J., E. Middelkoop, et al. (1994). "Dermal regeneration in native non-cross-linked collagen sponges with different extracellular matrix molecules." Wound Repair Regen **2**(1): 37-47.
- Debelle**, L. and A. J. Alix (1999). "The structures of elastins and their function." Biochimie **81**(10): 981-94.
- Debelle**, L. and A. M. Tamburro (1999). "Elastin: molecular description and function." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **31**(2): 261-272.
- Degterev**, A. and J. A. Foster (1999). "The role of NF-1 factors in regulation of elastin gene transcription." Matrix Biol **18**(3): 295-307.
- Deo**, S. V., H. M. Burkhart, et al. (2013). "Supravalvar aortic stenosis: current surgical approaches and outcomes." Expert Rev Cardiovasc Ther **11**(7): 879-90.
- Devy**, J., L. Duca, et al. (2010). "Elastin-derived peptides enhance melanoma growth in vivo by upregulating the activation of Mcol-A (MMP-1) collagenase." Br J Cancer **103**(10): 1562-70.
- Di Zio**, K. and D. A. Tirrell (2003). "Mechanical Properties of Artificial Protein Matrices Engineered for Control of Cell and Tissue Behavior." Macromolecules **36**(5): 1553-1558.
- Discher**, D. E., D. J. Mooney, et al. (2009). "Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells." Science (New York, N.Y.) **324**(5935): 1673-1677.
- Djajamuliadi**, J., T. F. Kagawa, et al. (2009). "Insights into a putative hinge region in elastin using molecular dynamics simulations." Matrix Biology **28**(2): 92-100.
- Djerassi**, C., T. Nakano, et al. (1961). "Terpenoids. XLVII.1 The Structure of Genipin2." The Journal of Organic Chemistry **26**(4): 1192-1206.

- Downing**, T. L., J. Soto, et al. (2013). "Biophysical regulation of epigenetic state and cell reprogramming." Nat Mater **12**(12): 1154-62.
- Dreher**, M. R., A. J. Simnick, et al. (2008). "Temperature Triggered Self-Assembly of Polypeptides into Multivalent Spherical Micelles." Journal of the American Chemical Society **130**(2): 687-694.
- Dridi**, S. M., A. Foucault Bertaud, et al. (2005). "Vascular wall remodeling in patients with supraaortic stenosis and Williams Beuren syndrome." J Vasc Res **42**(3): 190-201.
- Dridi**, S. M., S. Ghomrasseni, et al. (1999). "Skin elastic fibers in Williams syndrome." Am J Med Genet **87**(2): 134-8.
- Du**, A., B. Zhou, et al. (2013). "Reaction-Induced Microsyneresis in Oxide-Based Gels: The Assembly of Hierarchical Microsphere Networks." Langmuir **29**(36): 11208-11216.
- Dubin-Thaler**, B. J., G. Giannone, et al. (2004). "Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs." Biophys J **86**(3): 1794-806.
- Dyksterhuis**, L. B., C. Baldock, et al. (2007). "Domains 17-27 of tropoelastin contain key regions of contact for coacervation and contain an unusual turn-containing crosslinking domain." Matrix Biol **26**(2): 125-35.
- Dyksterhuis**, L. B. and A. S. Weiss (2010). "Homology models for domains 21-23 of human tropoelastin shed light on lysine crosslinking." Biochem Biophys Res Commun **396**(4): 870-3.
- Egozi**, E. I., A. M. Ferreira, et al. (2003). "Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds." Wound Repair Regen **11**(1): 46-54.
- Engler**, A. J., S. Sen, et al. (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." Cell **126**(4): 677-89.
- Fathi**, A., S. M. Mithieux, et al. (2014). "Elastin based cell-laden injectable hydrogels with tunable gelation, mechanical and biodegradation properties." Biomaterials **35**(21): 5425-35.
- Faucheux**, N., R. Tzoneva, et al. (2006). "The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry." Biomaterials **27**(2): 234-45.
- Fazio**, M. J., M. G. Mattei, et al. (1991). "Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7." Am J Hum Genet **48**(4): 696-703.
- Fingleton**, B. (2007). "Matrix metalloproteinases as valid clinical targets." Curr Pharm Des **13**(3): 333-46.
- Finney**, J., H. J. Moon, et al. (2014). "Human copper-dependent amine oxidases." Arch Biochem Biophys **546**: 19-32.
- Fioretti**, F., C. Mendoza-Palomares, et al. (2010). "Nanostructured assemblies for dental application." ACS Nano **4**(6): 3277-87.
- Fisher**, G. J., S. C. Datta, et al. (1996). "Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism." Nature **379**(6563): 335-9.
- Flamia**, R., P. A. Zhdan, et al. (2004). "AFM Study of the Elastin-like Biopolymer Poly(ValGlyGlyValGly)." Biomacromolecules **5**(4): 1511-1518.
- Fornieri**, C., F. Taparelli, et al. (1999). "The effect of caloric restriction on the aortic tissue of aging rats." Connect Tissue Res **40**(2): 131-43.

- Gao, L., H. Gan, et al.** (2014). "Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **117**(0): 398-405.
- Garcia-Arevalo, C., M. Pierna, et al.** (2012). "A comparative study of cell behavior on different energetic and bioactive polymeric surfaces made from elastin-like recombinamers." Soft Matter **8**(11): 3239-3249.
- Ge, X., Y. Ren, et al.** (2012). "Modeling supravalvular aortic stenosis syndrome with human induced pluripotent stem cells." Circulation **126**(14): 1695-704.
- Gheduzzi, D., D. Guerra, et al.** (2005). "Heparan sulphate interacts with tropoelastin, with some tropoelastin peptides and is present in human dermis elastic fibers." Matrix Biol **24**(1): 15-25.
- Gill, S. E. and W. C. Parks** (2008). "Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing." The international journal of biochemistry & cell biology **40**(6-7): 1334-1347.
- Goodwin, A. E. and B. U. Pauli** (1995). "A new adhesion assay using buoyancy to remove non-adherent cells." Journal of Immunological Methods **187**(2): 213-219.
- Gray, W. R., L. B. Sandberg, et al.** (1973). "Molecular model for elastin structure and function." Nature **246**(5434): 461-6.
- Green, E. M., J. C. Mansfield, et al.** (2014). "The structure and micromechanics of elastic tissue." Interface Focus **4**(2): 20130058.
- Grinnell, F.** (1982). "Fibronectin and wound healing." Am J Dermatopathol **4**(2): 185-8.
- Gurtner, G. C., S. Werner, et al.** (2008). "Wound repair and regeneration." Nature **453**(7193): 314-21.
- Hahn, C. N., M. del Pilar Martin, et al.** (1997). "Generalized CNS disease and massive GM1-ganglioside accumulation in mice defective in lysosomal acid beta-galactosidase." Hum Mol Genet **6**(2): 205-11.
- Hamalainen, E. R., R. Kemppainen, et al.** (1993). "Structure of the human lysyl oxidase gene." Genomics **17**(3): 544-8.
- Hassouneh, W., T. Christensen, et al.** (2010). "Elastin-like Polypeptides as a Purification Tag for Recombinant Proteins." Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.] **CHAPTER: Unit-6.11**.
- He, D., M. Miao, et al.** (2012). "Polymorphisms in the human tropoelastin gene modify in vitro self-assembly and mechanical properties of elastin-like polypeptides." PLoS One **7**(9): e46130.
- Heim, R. A., R. A. Pierce, et al.** (1991). "Alternative splicing of rat tropoelastin mRNA is tissue-specific and developmentally regulated." Matrix **11**(5): 359-66.
- Heino, J., R. A. Ignatz, et al.** (1989). "Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit." J Biol Chem **264**(1): 380-8.
- Heinz, A., M. C. Jung, et al.** (2010). "Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases--cleavage site specificities and release of matrikines." FEBS J **277**(8): 1939-56.

- Heinz**, A., M. C. Jung, et al. (2012). "The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor." Biochimie **94**(1): 192-202.
- Helary**, C., A. Foucault-Bertaud, et al. (2005). "Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and metalloproteinases expression." Biomaterials **26**(13): 1533-1543.
- Helske**, S., M. Kupari, et al. (2007). "Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process." Curr Opin Lipidol **18**(5): 483-91.
- Hertz**, H. (1882). Über die Berührung fester elastischer Körper. Journal für die reine und angewandte Mathematik **1882**: 156.
- Hinek**, A., J. Boyle, et al. (1992). "Vascular smooth muscle cell detachment from elastin and migration through elastic laminae is promoted by chondroitin sulfate-induced "shedding" of the 67-kDa cell surface elastin binding protein." Exp Cell Res **203**(2): 344-53.
- Hinek**, A., A. V. Pshezhetsky, et al. (2006). "Lysosomal sialidase (neuraminidase-1) is targeted to the cell surface in a multiprotein complex that facilitates elastic fiber assembly." J Biol Chem **281**(6): 3698-710.
- Hinek**, A. and M. Rabinovitch (1994). "67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin." J Cell Biol **126**(2): 563-74.
- Hinz**, B. (2007). "Formation and function of the myofibroblast during tissue repair." J Invest Dermatol **127**(3): 526-37.
- Hoeve**, C. A. and P. J. Flory (1974). "The elastic properties of elastin." Biopolymers **13**(4): 677-86.
- Holzenberger**, M., S. A. Levi-Minzi, et al. (1993). "Quantitation of tropoelastin mRNA and assessment of alternative splicing in human skin fibroblasts by reverse transcriptase-polymerase chain reaction." PCR Methods Appl **3**(2): 107-14.
- Hrabchak**, C., J. Rouleau, et al. (2010). "Assessment of biocompatibility and initial evaluation of genipin cross-linked elastin-like polypeptides in the treatment of an osteochondral knee defect in rabbits." Acta Biomater **6**(6): 2108-15.
- Hubmacher**, D. and S. S. Apte (2015). "ADAMTS proteins as modulators of microfibril formation and function." Matrix Biol.
- Hubmacher**, D., K. Tiedemann, et al. (2006). "Fibrillins: from biogenesis of microfibrils to signaling functions." Curr Top Dev Biol **75**: 93-123.
- Huet**, E., B. Brassart, et al. (2001). "[Effect of elastin peptides on the production of matrix metalloproteinase 2 by human skin fibroblasts in culture]." J Soc Biol **195**(2): 165-72.
- Hung**, H.-S., M.-Y. Chu, et al. (2012). "Mediation of the migration of endothelial cells and fibroblasts on polyurethane nanocomposites by the activation of integrin-focal adhesion kinase signaling." Journal of Biomedical Materials Research Part A **100A**(1): 26-37.
- Hynes**, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-87.
- Jacob**, M. P. (2006). "[Extracellular matrix and vascular ageing]." Med Sci (Paris) **22**(3): 273-8.

- Jensen, S. A., D. P. Reinhardt, et al.** (2001). "Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1." J Biol Chem **276**(43): 39661-6.
- Jensen, S. A., I. B. Robertson, et al.** (2012). "Dissecting the fibrillin microfibril: structural insights into organization and function." Structure **20**(2): 215-25.
- Jensen, S. A., B. Vrhovski, et al.** (2000). "Domain 26 of tropoelastin plays a dominant role in association by coacervation." J Biol Chem **275**(37): 28449-54.
- Johnson, D. J., P. Robson, et al.** (1995). "Decreased elastin synthesis in normal development and in long-term aortic organ and cell cultures is related to rapid and selective destabilization of mRNA for elastin." Circ Res **77**(6): 1107-13.
- Kagan, H. M. and K. A. Sullivan** (1982). "Lysyl oxidase: preparation and role in elastin biosynthesis." Methods Enzymol **82 Pt A**: 637-50.
- Kahari, V. M., Y. Q. Chen, et al.** (1992). "Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human elastin gene expression. Evidence for the role of AP-1 in the suppression of promoter activity." J Biol Chem **267**(36): 26134-41.
- Kahari, V. M. and U. Saarialho-Kere** (1997). "Matrix metalloproteinases in skin." Exp Dermatol **6**(5): 199-213.
- Kamoun, A., J. M. Landeau, et al.** (1995). "Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides." Cell Adhes Commun **3**(4): 273-81.
- Karnik, S. K., J. D. Wythe, et al.** (2003). "Elastin induces myofibrillogenesis via a specific domain, VGVAPG." Matrix Biol **22**(5): 409-25.
- Kato, A., O. Okamoto, et al.** (2011). "Dermatopontin interacts with fibronectin, promotes fibronectin fibril formation, and enhances cell adhesion." J Biol Chem **286**(17): 14861-9.
- Katzberg, A. A.** (1958). "The area of the dermo-epidermal junction in human skin." The Anatomical Record **131**(4): 717-725.
- Keeley, F. W., C. M. Bellingham, et al.** (2002). "Elastin as a self-organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1418): 185-9.
- Kelly, S. M., T. J. Jess, et al.** (2005). "How to study proteins by circular dichroism." Biochim Biophys Acta **1751**(2): 119-39.
- Kielty, C. M., C. Baldock, et al.** (2002). "Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1418): 207-17.
- Kielty, C. M., M. J. Sherratt, et al.** (2002). "Elastic fibres." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2817-28.
- Kielty, C. M., S. P. Whittaker, et al.** (1996). "Fibrillin: evidence that chondroitin sulphate proteoglycans are components of microfibrils and associate with newly synthesised monomers." FEBS Lett **386**(2-3): 169-73.
- Kim, W., J. Thevenot, et al.** (2010). "Self-assembly of thermally responsive amphiphilic diblock copolypeptides into spherical micellar nanoparticles." Angew Chem Int Ed Engl **49**(25): 4257-60.
- Kinikoglu, B., J. C. Rodriguez-Cabello, et al.** (2011). "A smart bilayer scaffold of elastin-like recombinamer and collagen for soft tissue engineering." J Mater Sci Mater Med **22**(6): 1541-54.

- Kiyozumi**, T., Y. Kanatani, et al. (2006). "Medium (DMEM/F12)-containing chitosan hydrogel as adhesive and dressing in autologous skin grafts and accelerator in the healing process." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **79**(1): 129-36.
- Kleiner**, D. E. and W. G. Stetlerstevenson (1994). "Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases." *Analytical Biochemistry* **218**(2): 325-329.
- Kloxin**, A. M., J. A. Benton, et al. (2010). "In situ elasticity modulation with dynamic substrates to direct cell phenotype." *Biomaterials* **31**(1): 1-8.
- Kobayashi**, N., G. Kostka, et al. (2007). "A Comparative Analysis of the Fibulin Protein Family: BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION, BINDING INTERACTIONS, AND TISSUE LOCALIZATION." *Journal of Biological Chemistry* **282**(16): 11805-11816.
- Korotayev**, K., M. Chaussepied, et al. (2008). "ERK activation is regulated by E2F1 and is essential for E2F1-induced S phase entry." *Cell Signal* **20**(6): 1221-6.
- Kozel**, B. A., C. H. Ciliberto, et al. (2004). "Deposition of tropoelastin into the extracellular matrix requires a competent elastic fiber scaffold but not live cells." *Matrix Biol* **23**(1): 23-34.
- Kozel**, B. A., B. J. Rongish, et al. (2006). "Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters." *J Cell Physiol* **207**(1): 87-96.
- Kozel**, B. A., H. Wachi, et al. (2003). "Domains in tropoelastin that mediate elastin deposition in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **278**(20): 18491-8.
- Krafts**, K. P. (2010). "Tissue repair: The hidden drama." *Organogenesis* **6**(4): 225-33.
- Kumashiro**, K. K., J. P. Ho, et al. (2006). "Cooperativity between the hydrophobic and cross-linking domains of elastin." *J Biol Chem* **281**(33): 23757-65.
- Laemmli**, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Laird**, P. W. (2005). "Cancer epigenetics." *Hum Mol Genet* **14**(suppl 1): R65-R76.
- Lakatta**, E. G. and D. Levy (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease." *Circulation* **107**(1): 139-46.
- Lampe**, K. J., A. L. Antaris, et al. (2013). "Design of 3D engineered protein hydrogels for tailored control of neurite growth." *Acta biomaterialia* **9**(3): 5590-5599.
- Langton**, A. K., M. J. Sherratt, et al. (2010). "A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing." *Int J Cosmet Sci* **32**(5): 330-9.
- Laurent**, L., E. Wong, et al. (2010). "Dynamic changes in the human methylome during differentiation." *Genome Res* **20**(3): 320-31.
- Le Brun**, A. P., J. Chow, et al. (2012). "Molecular orientation of tropoelastin is determined by surface hydrophobicity." *Biomacromolecules* **13**(2): 379-86.
- Lee**, P., D. V. Bax, et al. (2014). "A novel cell adhesion region in tropoelastin mediates attachment to integrin alphaVbeta5." *J Biol Chem* **289**(3): 1467-77.
- Lemaire**, R., J. Bayle, et al. (2007). "Microfibril-associated MAGP-2 stimulates elastic fiber assembly." *J Biol Chem* **282**(1): 800-8.

- Levenson**, S. M., E. F. Geever, et al. (1965). "THE HEALING OF RAT SKIN WOUNDS." Ann Surg **161**: 293-308.
- Li**, B., D. O. V. Alonso, et al. (2001). "The molecular basis for the inverse temperature transition of elastin1." Journal of Molecular Biology **305**(3): 581-592.
- Liu**, X., Y. Zhao, et al. (2004). "Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein." Nat Genet **36**(2): 178-82.
- Liu**, Y., Y. Guo, et al. (2013). "Targeting caspase-3 as dual therapeutic benefits by RNAi facilitating brain-targeted nanoparticles in a rat model of Parkinson's disease." PLoS One **8**(5): e62905.
- Livak**, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lomakin**, A., D. B. Teplow, et al. (2005). "Quasielastic light scattering for protein assembly studies." Methods Mol Biol **299**: 153-74.
- Lovvorn**, H. N., 3rd, D. T. Cheung, et al. (1999). "Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair." J Pediatr Surg **34**(1): 218-23.
- Lu**, H., L. Guo, et al. (2009). "Effects of poly(L-lysine), poly(acrylic acid) and poly(ethylene glycol) on the adhesion, proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." J Biomater Sci Polym Ed **20**(5-6): 577-89.
- Luan**, C. H., T. M. Parker, et al. (1991). "Differential scanning calorimetry studies of NaCl effect on the inverse temperature transition of some elastin-based polytetra-, polypenta-, and polynona peptides." Biopolymers **31**(5): 465-75.
- Lyerla**, J. R., Jr. and D. A. Torchia (1975). "Molecular mobility and structure of elastin deduced from the solvent and temperature dependence of ¹³C magnetic resonance relaxation data." Biochemistry **14**(23): 5175-83.
- MacEwan**, S. R. and A. Chilkoti (2014). "Applications of elastin-like polypeptides in drug delivery." J Control Release **190**: 314-30.
- Mammi**, M., L. Gotte, et al. (1968). "Evidence for order in the structure of alpha-elastin." Nature **220**(5165): 371-3.
- Marchase**, P., K. Holbrook, et al. (1980). "A familial cutis laxa syndrome with ultrastructural abnormalities of collagen and elastin." J Invest Dermatol **75**(5): 399-403.
- Martino**, M. and A. M. Tamburro (2001). "Chemical synthesis of cross-linked poly(KGGVG), an elastin-like biopolymer." Biopolymers **59**(1): 29-37.
- Mauviel**, A., Y. Q. Chen, et al. (1993). "Human recombinant interleukin-1 beta up-regulates elastin gene expression in dermal fibroblasts. Evidence for transcriptional regulation in vitro and in vivo." J Biol Chem **268**(9): 6520-4.
- Mazia**, D., G. Schatten, et al. (1975). "Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy." J Cell Biol **66**(1): 198-200.
- Mecham**, R. P. (1991). "Elastin synthesis and fiber assembly." Ann N Y Acad Sci **624**: 137-46.
- Mecham**, R. P., A. Hinek, et al. (1989). "Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein." Biochemistry **28**(9): 3716-22.

- Mendoza-Palomares, C., A. Ferrand, et al.** (2012). "Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics." ACS Nano **6**(1): 483-90.
- Metcalfe, A. D. and M. W. Ferguson** (2007). "Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration." J R Soc Interface **4**(14): 413-37.
- Meyer, D. E. and A. Chilkoti** (1999). "Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides." Nat Biotech **17**(11): 1112-1115.
- Meyer, D. E. and A. Chilkoti** (2002). "Genetically Encoded Synthesis of Protein-Based Polymers with Precisely Specified Molecular Weight and Sequence by Recursive Directional Ligation: Examples from the Elastin-like Polypeptide System." Biomacromolecules **3**(2): 357-367.
- Meyer, D. E. and A. Chilkoti** (2004). "Quantification of the Effects of Chain Length and Concentration on the Thermal Behavior of Elastin-like Polypeptides." Biomacromolecules **5**(3): 846-851.
- Miao, M., C. M. Bellingham, et al.** (2003). "Sequence and Structure Determinants for the Self-aggregation of Recombinant Polypeptides Modeled after Human Elastin." Journal of Biological Chemistry **278**(49): 48553-48562.
- Miao, M., J. T. Cirulis, et al.** (2005). "Structural determinants of cross-linking and hydrophobic domains for self-assembly of elastin-like polypeptides." Biochemistry **44**(43): 14367-75.
- Micale, L., M. G. Turturo, et al.** (2010). "Identification and characterization of seven novel mutations of elastin gene in a cohort of patients affected by supralvalvular aortic stenosis." European Journal of Human Genetics **18**(3): 317-323.
- Miranda, T. B. and P. A. Jones** (2007). "DNA methylation: the nuts and bolts of repression." J Cell Physiol **213**(2): 384-90.
- Mithieux, S. M. and A. S. Weiss** (2005). "Elastin." Adv Protein Chem **70**: 437-61.
- Mithieux, S. M., S. G. Wise, et al.** (2005). "A model two-component system for studying the architecture of elastin assembly in vitro." J Struct Biol **149**(3): 282-9.
- Mochizuki, S., B. Brassart, et al.** (2002). "Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells." J Biol Chem **277**(47): 44854-63.
- Montagna, W., S. Kirchner, et al.** (1989). "Histology of sun-damaged human skin." J Am Acad Dermatol **21**(5 Pt 1): 907-18.
- Morodomi, T., Y. Ogata, et al.** (1992). "Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma cells." Biochem J **285** (Pt 2): 603-11.
- Muiznieks, L. D., S. A. Jensen, et al.** (2003). "Structural changes and facilitated association of tropoelastin." Arch Biochem Biophys **410**(2): 317-23.
- Muiznieks, L. D. and F. W. Keeley** (2010). "Proline periodicity modulates the self-assembly properties of elastin-like polypeptides." J Biol Chem **285**(51): 39779-89.
- Muiznieks, L. D. and A. S. Weiss** (2007). "Flexibility in the solution structure of human tropoelastin." Biochemistry **46**(27): 8196-205.

- Muiznieks**, L. D., A. S. Weiss, et al. (2010). "Structural disorder and dynamics of elastin." Biochem Cell Biol **88**(2): 239-50.
- Nagae**, M., S. Re, et al. (2012). "Crystal structure of alpha5beta1 integrin ectodomain: atomic details of the fibronectin receptor." J Cell Biol **197**(1): 131-40.
- Narayanan**, A. S., R. C. Page, et al. (1978). "Elastin cross-linking in vitro. Studies on factors influencing the formation of desmosines by lysyl oxidase action on tropoelastin." Biochem J **173**(3): 857-62.
- Naylor**, E. C., R. E. Watson, et al. (2011). "Molecular aspects of skin ageing." Maturitas **69**(3): 249-56.
- Nivison-Smith**, L. B. and A. S. Weiss (2011). Elastin Based Constructs. Rijeka, Croatia, InTech Publishers.
- Nonaka**, R., F. Sato, et al. (2014). "Domain 36 of tropoelastin in elastic fiber formation." Biol Pharm Bull **37**(4): 698-702.
- Ostuni**, A., B. Bochicchio, et al. (2007). "Molecular and Supramolecular Structural Studies on Human Tropoelastin Sequences." Biophysical Journal **93**(10): 3640-3651.
- Pailler-Mattei**, C., S. Bec, et al. (2008). "In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests." Med Eng Phys **30**(5): 599-606.
- Pailler-Mattei**, C., L. Laquière, et al. (2014). "Rheological behaviour of reconstructed skin." Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials **37**(0): 251-263.
- Papke**, C. L. and H. Yanagisawa (2014). "Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies." Matrix Biol **37**: 142-9.
- Pasquali-Ronchetti**, I., M. Baccarani-Conti, et al. (1993). "Structure and composition of the elastin fibre in normal and pathological conditions." Micron **24**(1): 75-89.
- Paul**, R. G. and A. J. Bailey (1996). "Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes." Int J Biochem Cell Biol **28**(12): 1297-310.
- Pepe**, A., D. Guerra, et al. (2005). "Dissection of human tropoelastin: supramolecular organization of polypeptide sequences coded by particular exons." Matrix Biol **24**(2): 96-109.
- Pober**, B. R. (2010). "Williams-Beuren syndrome." N Engl J Med **362**(3): 239-52.
- Pocza**, P., H. Suli-Vargha, et al. (2008). "Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor." Int J Cancer **122**(9): 1972-80.
- Punet**, X., R. Mauchauffé, et al. (2013). "Enhanced Cell-Material Interactions through the Biofunctionalization of Polymeric Surfaces with Engineered Peptides." Biomacromolecules **14**(8): 2690-2702.
- Puolakkainen**, P. A., D. R. Twardzik, et al. (1995). "The enhancement in wound healing by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) depends on the topical delivery system." J Surg Res **58**(3): 321-9.
- Raghunath**, M., T. Bachi, et al. (1996). "Fibrillin and elastin expression in skin regenerating from cultured keratinocyte autografts: morphogenesis of microfibrils begins at the dermo-epidermal junction and precedes elastic fiber formation." J Invest Dermatol **106**(5): 1090-5.

- Ramirez**, F. (2000). "Pathophysiology of the microfibril/elastic fiber system: introduction." Matrix Biol **19**(6): 455-6.
- Rapaka**, R. S. and D. W. Urry (1978). "Coacervation of sequential polypeptide models of tropoelastin. Synthesis of H-(Val-Ala-Pro-Gly)_n-Val-OMe and H-(Val-Pro-Gly-Gly)_n-Val-OMe." Int J Pept Protein Res **11**(2): 97-108.
- Rauscher**, S., S. Baud, et al. (2006). "Proline and glycine control protein self-organization into elastomeric or amyloid fibrils." Structure **14**(11): 1667-76.
- Rauscher**, S., C. Neale, et al. (2009). "Simulated Tempering Distributed Replica Sampling, Virtual Replica Exchange, and Other Generalized-Ensemble Methods for Conformational Sampling." Journal of Chemical Theory and Computation **5**(10): 2640-2662.
- Reguera**, J., D. W. Urry, et al. (2007). "Effect of NaCl on the Exothermic and Endothermic Components of the Inverse Temperature Transition of a Model Elastin-like Polymer." Biomacromolecules **8**(2): 354-358.
- Reichheld**, S. E., L. D. Muiznieks, et al. (2014). "Conformational transitions of the cross-linking domains of elastin during self-assembly." J Biol Chem **289**(14): 10057-68.
- Reitamo**, S., A. Remitz, et al. (1994). "Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression in vivo and in vitro at the transcriptional level." Biochem J **302** (Pt 2): 331-3.
- Rnjak-Kovacina**, J., S. G. Wise, et al. (2012). "Electrospun synthetic human elastin:collagen composite scaffolds for dermal tissue engineering." Acta Biomater **8**(10): 3714-22.
- Rnjak**, J., Z. Li, et al. (2009). "Primary human dermal fibroblast interactions with open weave three-dimensional scaffolds prepared from synthetic human elastin." Biomaterials **30**(32): 6469-77.
- Rnjak**, J., S. G. Wise, et al. (2011). "Severe burn injuries and the role of elastin in the design of dermal substitutes." Tissue Eng Part B Rev **17**(2): 81-91.
- Robert**, L., A. M. Robert, et al. (2008). "Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin?" Biogerontology **9**(2): 119-33.
- Roberts**, S., M. Dzuricky, et al. (2015). "Elastin-like polypeptides as models of intrinsically disordered proteins." FEBS Lett.
- Robinet**, A., A. Fahem, et al. (2005). "Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP." J Cell Sci **118**(Pt 2): 343-56.
- Rodríguez-Cabello**, J. C., L. Martín, et al. (2009). "'Recombinamers' as advanced materials for the post-oil age." Polymer **50**(22): 5159-5169.
- Rodríguez-Revenge**, L., P. Iranzo, et al. (2004). "A novel elastin gene mutation resulting in an autosomal dominant form of cutis laxa." Arch Dermatol **140**(9): 1135-9.
- Romanic**, A. M., S. M. Harrison, et al. (2002). "Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9." Cardiovasc Res **54**(3): 549-58.
- Romero**, N., D. Tinker, et al. (1986). "Role of plasma and serum proteases in the degradation of elastin." Arch Biochem Biophys **244**(1): 161-8.
- Romestand**, B., J. L. Rolland, et al. (2010). "Dendrigrft poly-L-lysine: a non-immunogenic synthetic carrier for antibody production." Biomacromolecules **11**(5): 1169-73.

- Rosano**, G. L. and E. A. Ceccarelli (2014). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges." Frontiers in Microbiology **5**: 172.
- Rosenbloom**, J., M. Bashir, et al. (1991). "Elastin genes and regulation of their expression." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **1**(3): 145-56.
- Rosenbloom**, J. and A. Cywinski (1976). "Biosynthesis and secretion of tropoelastin by chick aorta cells." Biochem Biophys Res Commun **69**(3): 613-20.
- Ross**, R., R. J. Fialkow, et al. (1977). "The morphogenesis of elastic fibers." Adv Exp Med Biol **79**: 7-17.
- Ruiz-Garcia**, A., M. Bermejo, et al. (2008). "Pharmacokinetics in Drug Discovery." Journal of Pharmaceutical Sciences **97**(2): 654-690.
- Rusciani**, A., L. Duca, et al. (2010). "Elastin Peptides Signaling Relies on Neuraminidase-1-Dependent Lactosylceramide Generation." PLoS One **5**(11): e14010.
- Sabatier**, L., N. Miosge, et al. (2011). "Fibrillin-3 expression in human development." Matrix Biol **30**(1): 43-52.
- Sallach**, R. E., V. P. Conticello, et al. (2009). "Expression of a Recombinant Elastin-Like Protein in *Pichia pastoris*." Biotechnology progress **25**(6): 1810-1818.
- Sarkar**, R., C. Kaur, et al. (2002). "Cutis laxa in seven members of a north-Indian family." Pediatr Dermatol **19**(3): 229-31.
- Sarrazy**, V., F. Billet, et al. (2011). "Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments." Wound Repair Regen **19 Suppl 1**: s10-5.
- Sasaki**, T., W. Göhring, et al. (1999). "Tropoelastin binding to fibulins, nidogen-2 and other extracellular matrix proteins." FEBS Letters **460**(2): 280-284.
- Sato**, F., H. Wachi, et al. (2007). "Distinct steps of cross-linking, self-association, and maturation of tropoelastin are necessary for elastic fiber formation." J Mol Biol **369**(3): 841-51.
- Sato**, F., H. Wachi, et al. (2006). "The characteristics of elastic fiber assembled with recombinant tropoelastin isoform." Clin Biochem **39**(7): 746-53.
- Sato**, F., H. Wachi, et al. (2006). "Biochemical Analysis of Elastic Fiber Formation with a Frameshift-Mutated Tropoelastin (fmTE) at the C-Terminus of Tropoelastin." Journal of health science **52**(3): 259-267.
- Schek**, R. M., A. J. Michalek, et al. (2011). "GENIPIN-CROSSLINKED FIBRIN HYDROGELS AS A POTENTIAL ADHESIVE TO AUGMENT INTERVERTEBRAL DISC ANNULUS REPAIR." European cells & materials **21**: 373-383.
- Schneider**, C. A., W. S. Rasband, et al. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Methods **9**(7): 671-5.
- Schubert**, C. (2009). "The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome." Cell Mol Life Sci **66**(7): 1178-97.
- Scott**, M. and I. Vesely (1995). "Aortic valve cusp microstructure: the role of elastin." Ann Thorac Surg **60**(2 Suppl): S391-4.

- Segade**, F., B. C. Trask, et al. (2002). "Identification of a matrix-binding domain in MAGP1 and MAGP2 and intracellular localization of alternative splice forms." J Biol Chem **277**(13): 11050-7.
- Shah**, M., P.-Y. Hsueh, et al. (2012). "Biodegradation of elastin-like polypeptide nanoparticles." Protein Science : A Publication of the Protein Society **21**(6): 743-750.
- Shapiro**, S. D., S. K. Endicott, et al. (1991). "Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon." J Clin Invest **87**(5): 1828-34.
- Shepherd**, J., P. Sarker, et al. (2011). "Hyperbranched poly(NIPAM) polymers modified with antibiotics for the reduction of bacterial burden in infected human tissue engineered skin." Biomaterials **32**(1): 258-67.
- Sherratt**, M. J. (2009). "Tissue elasticity and the ageing elastic fibre." Age (Dordr) **31**(4): 305-25.
- Shin**, H. J., W. K. Jhang, et al. (2011). "Modified simple sliding aortoplasty for preserving the sinotubular junction without using foreign material for congenital supralvalvar aortic stenosis." Eur J Cardiothorac Surg **40**(3): 598-602.
- Siegel**, R. C., S. R. Pinnell, et al. (1970). "Cross-linking of collagen and elastin. Properties of lysyl oxidase." Biochemistry **9**(23): 4486-92.
- Silva**, N. H. C. S., C. Vilela, et al. (2014). "Protein-based materials: from sources to innovative sustainable materials for biomedical applications." Journal of Materials Chemistry B **2**(24): 3715-3740.
- Smola**, H., G. Thiekotter, et al. (1993). "Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction." J Cell Biol **122**(2): 417-29.
- Sneddon**, I. N. (1965). "The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile." International Journal of Engineering Science **3**(1): 47-57.
- Song**, H. and J. Parkinson (2012). "Modelling the self-assembly of elastomeric proteins provides insights into the evolution of their domain architectures." PLoS Comput Biol **8**(3): e1002406.
- Spezzacatena**, C., T. Perri, et al. (2002). "Classical Synthesis of and Structural Studies on a Biologically Active Heptapeptide and a Nonapeptide of Bovine Elastin." European Journal of Organic Chemistry **2002**(1): 95-103.
- Stachelscheid**, H., H. Ibrahim, et al. (2008). "Epidermal insulin/IGF-1 signalling control interfollicular morphogenesis and proliferative potential through Rac activation." The EMBO Journal **27**(15): 2091-2101.
- Swierczewska**, M., C. S. Hajicharalambous, et al. (2008). "Cellular response to nanoscale elastin-like polypeptide polyelectrolyte multilayers." Acta Biomaterialia **4**(4): 827-837.
- Szabo**, Z., M. W. Crepeau, et al. (2006). "Aortic aneurysmal disease and cutis laxa caused by defects in the elastin gene." J Med Genet **43**(3): 255-8.
- Taddese**, S., A. S. Weiss, et al. (2009). "In vitro degradation of human tropoelastin by MMP-12 and the generation of matrikines from domain 24." Matrix Biol **28**(2): 84-91.

- Takagi, J.** (2004). "Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins." Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 403-6.
- Tamburro, A. M., B. Bochicchio, et al.** (2003). "Dissection of human tropoelastin: exon-by-exon chemical synthesis and related conformational studies." Biochemistry **42**(45): 13347-62.
- Tamburro, A. M., B. Bochicchio, et al.** (2005). "The dissection of human tropoelastin: from the molecular structure to the self-assembly to the elasticity mechanism." Pathol Biol (Paris) **53**(7): 383-9.
- Tamburro, A. M., V. Guantieri, et al.** (1991). "Polypeptide models of elastin: CD and NMR studies on synthetic poly(X-Gly-Gly)." Chirality **3**(4): 318-323.
- Tang, S. S., P. C. Trackman, et al.** (1983). "Reaction of aortic lysyl oxidase with beta-aminopropionitrile." J Biol Chem **258**(7): 4331-8.
- Tejeda-Montes, E., A. Klymov, et al.** (2014). "Mineralization and bone regeneration using a bioactive elastin-like recombinamer membrane." Biomaterials **35**(29): 8339-47.
- Todorovic, V., V. Jurukovski, et al.** (2005). "Latent TGF-beta binding proteins." Int J Biochem Cell Biol **37**(1): 38-41.
- Toonkool, P., S. A. Jensen, et al.** (2001). "Hydrophobic domains of human tropoelastin interact in a context-dependent manner." J Biol Chem **276**(48): 44575-80.
- Torchilin, V. P. and A. N. Lukyanov** (2003). "Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions." Drug Discovery Today **8**(6): 259-266.
- Trabbic-Carlson, K., D. E. Meyer, et al.** (2004). "Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: a role for surface hydrophobicity?" Protein Eng Des Sel **17**(1): 57-66.
- Tredget, E. E.** (2007). "The basis of fibrosis and wound healing disorders following thermal injury." J Trauma **62**(6 Suppl): S69.
- Troy, J., R. Karlinski, et al.** (2013). "The Use of EZ Derm® in Partial-Thickness Burns: An Institutional Review of 157 Patients." Eplasty **13**: e14.
- Tu, Y., S. G. Wise, et al.** (2010). "Stages in tropoelastin coalescence during synthetic elastin hydrogel formation." Micron **41**(3): 268-72.
- Uitto, J.** (1997). "Understanding premature skin aging." N Engl J Med **337**(20): 1463-5.
- Uitto, J., A. M. Christiano, et al.** (1991). "Molecular biology and pathology of human elastin." Biochem Soc Trans **19**(4): 824-9.
- Umeda, H., F. Nakamura, et al.** (2001). "Oxodesmosine and isooxodesmosine, candidates of oxidative metabolic intermediates of pyridinium cross-links in elastin." Arch Biochem Biophys **385**(1): 209-19.
- Urban, Z., S. Riazi, et al.** (2002). "Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams-Beuren syndrome." Am J Hum Genet **71**(1): 30-44.
- Urban, Z., J. Zhang, et al.** (2001). "Supravalvular aortic stenosis: genetic and molecular dissection of a complex mutation in the elastin gene." Hum Genet **109**(5): 512-20.
- Urry, D. W.** (1982). "Characterization of soluble peptides of elastin by physical techniques." Methods Enzymol **82 Pt A**: 673-716.

- Urry, D. W.** (1988). "Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics." J Protein Chem **7**(1): 1-34.
- Urry, D. W.** (2004). "The change in Gibbs free energy for hydrophobic association: Derivation and evaluation by means of inverse temperature transitions." Chemical Physics Letters **399**(1-3): 177-183.
- Urry, D. W., D. C. Gowda, et al.** (1992). "Hydrophobicity scale for proteins based on inverse temperature transitions." Biopolymers **32**(9): 1243-1250.
- Urry, D. W., T. Hugel, et al.** (2002). "Elastin: a representative ideal protein elastomer." Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences **357**(1418): 169-184.
- Urry, D. W., M. M. Long, et al.** (1974). "Circular dichroism and absorption of the polytetrapeptide of elastin: a polymer model for the beta-turn." Biochem Biophys Res Commun **61**(4): 1427-33.
- Urry, D. W., C. H. Luan, et al.** (1997). Protein-Based Materials with a Profound Range of Properties and Applications: The Elastin ΔT_t Hydrophobic Paradigm. Protein-Based Materials. K. McGrath and D. Kaplan, Birkhäuser Boston: 133-177.
- Urry, D. W., B. Starcher, et al.** (1969). "Coacervation of solubilized elastin effects a notable conformational change." Nature **222**(5195): 795-6.
- Ushiki, T.** (1992). "[The three-dimensional ultrastructure of the collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers: a review]." Kaibogaku Zasshi **67**(3): 186-99.
- Vakonakis, I. and I. D. Campbell** (2007). "Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure." Curr Opin Cell Biol **19**(5): 578-83.
- van der Lee, R., M. Buljan, et al.** (2014). "Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins." Chemical Reviews **114**(13): 6589-6631.
- van Eldijk, M. B., C. L. McGann, et al.** (2012). "Elastomeric Polypeptides." Topics in current chemistry **310**: 71-116.
- Varani, J., R. L. Warner, et al.** (2000). "Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin." J Invest Dermatol **114**(3): 480-6.
- Vijg, J. and J. Campisi** (2008). "Puzzles, promises and a cure for ageing." Nature **454**(7208): 1065-71.
- Votteler, M., D. A. Berrio, et al.** (2013). "Elastogenesis at the onset of human cardiac valve development." Development **140**(11): 2345-53.
- Vrhovski, B. and A. S. Weiss** (1998). "Biochemistry of tropoelastin." Eur J Biochem **258**(1): 1-18.
- Wachi, H., F. Sato, et al.** (2007). "Domains 16 and 17 of tropoelastin in elastic fibre formation." Biochem J **402**(1): 63-70.
- Wachi, H., Y. Seyama, et al.** (1995). "Stimulation of cell proliferation and autoregulation of elastin expression by elastin peptide VPGVG in cultured chick vascular smooth muscle cells." FEBS Lett **368**(2): 215-9.

- Wang, N., J. D. Tytell, et al. (2009).** "Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 75-82.
- Watson, R. E., N. M. Craven, et al. (2001).** "A short-term screening protocol, using fibrillin-1 as a reporter molecule, for photoaging repair agents." J Invest Dermatol **116**(5): 672-8.
- Weis-Fogh, T. and S. O. Anderson (1970).** "New molecular model for the long-range elasticity of elastin." Nature **227**(5259): 718-21.
- Williams, J. C., B. G. Barratt-Boyes, et al. (1961).** "Supravalvular aortic stenosis." Circulation **24**: 1311-8.
- Wilson, B. D., C. C. Gibson, et al. (2011).** "Novel approach for endothelializing vascular devices: understanding and exploiting elastin-endothelial interactions." Ann Biomed Eng **39**(1): 337-46.
- Wipff, P.-J., D. B. Rifkin, et al. (2007).** "Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix." J Cell Biol **179**(6): 1311-1323.
- Wise, S. G., M. J. Byrom, et al. (2011).** "A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties." Acta Biomaterialia **7**(1): 295-303.
- Wise, S. G., S. M. Mithieux, et al. (2005).** "Specificity in the coacervation of tropoelastin: solvent exposed lysines." J Struct Biol **149**(3): 273-81.
- Wise, S. G. and A. S. Weiss (2009).** "Tropoelastin." Int J Biochem Cell Biol **41**(3): 494-7.
- Wise, S. G., G. C. Yeo, et al. (2014).** "Tropoelastin: a versatile, bioactive assembly module." Acta Biomater **10**(4): 1532-41.
- Wu, X., R. Sallach, et al. (2005).** "Alterations in Physical Cross-Linking Modulate Mechanical Properties of Two-Phase Protein Polymer Networks." Biomacromolecules **6**(6): 3037-3044.
- Wu, Y., J. A. MacKay, et al. (2009).** "Fabrication of Elastin-Like Polypeptide Nanoparticles for Drug Delivery by Electrospraying." Biomacromolecules **10**(1): 19.
- Xerri, B., D. Clerc, et al. (1991).** "[Association of sclerodermatomyositis and humero-scapular retractile capsulitis. A new case]." Rev Rhum Mal Osteoartic **58**(12): 901.
- Xu, D., D. Asai, et al. (2012).** "Rheological Properties of Cysteine-Containing Elastin-Like-Polypeptide Solutions and Hydrogels." Biomacromolecules **13**(8): 2315-2321.
- Yaar, M. and B. A. Gilchrest (2007).** "Photoageing: mechanism, prevention and therapy." Br J Dermatol **157**(5): 874-87.
- Yanagisawa, H. and E. C. Davis (2010).** "Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **42**(7): 1084-1093.
- Yang, H. and W. J. Kao (2007).** "Synthesis and characterization of nanoscale dendritic RGD clusters for potential applications in tissue engineering and drug delivery." Int J Nanomedicine **2**(1): 89-99.
- Yeo, G. C., B. Aghaei-Ghareh-Bolagh, et al. (2015).** "Fabricated Elastin." Adv Healthc Mater.

Yeo, G. C., C. Baldock, et al. (2012). "Tropoelastin bridge region positions the cell-interactive C terminus and contributes to elastic fiber assembly." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(8): 2878-2883.

Yeo, G. C., F. W. Keeley, et al. (2011). "Coacervation of tropoelastin." Advances in Colloid and Interface Science **167**(1&2): 94-103.

Zanetti, M., P. Braghetta, et al. (2004). "EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects." Mol Cell Biol **24**(2): 638-50.

Zhang, J., L. Wu, et al. (2012). "Pro-inflammatory phenotype of COPD fibroblasts not compatible with repair in COPD lung." J Cell Mol Med **16**(7): 1522-32.

Zimmermann, D. R., M. T. Dours-Zimmermann, et al. (1994). "Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis." J Cell Biol **124**(5): 817-25.